N° D'ORDRE : 72

THESE

présentée à

L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR-INGENIEUR

par

M. Khamoeum NORNG

RECHERCHES SUR LA LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LE *BOTRYTIS CINEREA* PERS., PARASITE DE LA VIGNE, PAR UTILISATION D'ANTAGONISTES FONGIQUES.

ETUDES PRINCIPALEMENT *IN VITRO*.

Soutenue le 16 Novembre 1979 devant le jury composé de :

M. HAMANT	Président
M. ALBERTINI	Examinateurs
M. FREYDIER	
M. LABAT	
M. MICHEL	
M. SY	

N° D'ORDRE : 72

THESE

présentée à

L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR-INGENIEUR

par

M. Khamoeum NORNG

RECHERCHES SUR LA LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LE *BOTRYTIS CINEREA* PERS., PARASITE DE LA VIGNE, PAR UTILISATION D'ANTAGONISTES FONGIQUES.

ETUDES PRINCIPALEMENT IN VITRO.

Soutenue le 16 Novembre 1979 devant le jury composé de :

M. HAMANT Président

M. ALBERTINI
M. FREYDIER
M. LABAT
M. MICHEL
M. SY

} Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

RESIDENT D'HONNEUR

. le Professeur ESCANDE
embre de l'Institut

RESIDENT

. le Professeur MONTEL

ICE-PRESIDENTS

I. CONSTANT	Professeur
I. ENJALBERT	Professeur
I. MARTY	Professeur
I. ANDRE	Maître-Assistant
Directeur de l'E.N.S.A.T.	Monsieur le Professeur RAYNAUD
Directeur de l'E.N.S.C.T.	Monsieur le Professeur LATTES
Directeur de l'E.N.S.E.E.I.H.T.	Monsieur le Professeur NOUGARO
Directeur de l'I.G.C.	Monsieur le Professeur GARDY

SECRETAIRE GENERAL

M. CRAMPES

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BIREBENT
M. ESCANDE - Membre de l'Institut
M. DIEHL
M. HAMANT

PROFESSEURS

M. ALBERTINI	Sciences Agronomiques
M. ANGELINO	Génie Chimique
M. BAJON	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. BAUDRAND	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. BELLET	Mécanique
Melle BERDUCOU	Biologie et Biochimie Appliquées, Sciences Agronomiques
M. BOURGEAT	Minéralogie, Géochimie, Pétrographie et Géologie Appliquée
M. BRUEL	Informatique fondamentale et appliquée
M. BUIS	Biologie et Physiologie végétale
M. BUGAREL	Génie Chimique
M. CANDAU	Biologie et Biochimie Appliquées, Sciences Agronomiques
M. CONSTANT	Chimie minérale
M. COSTES	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. COUDERC	Génie Chimique
M. DABOSI	Chimie Appliquée et Chimie des Matériaux
M. DAT	Mécanique
M. ECOCHARD	Biologie et Biochimie Appliquées, Sciences Agronomiques

M. ENJALBERT	Génie Chimique
M. FABRE	Mécanique
M. FALLOT	Biologie et Biochimie Appliquées,Sciences Agronomiques
M. FOCH	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. GARDY	Génie Chimique
M. GASET	Chimie Organique Appliquée et Chimie des Matériaux
M. GILOT	Chimie Appliquée et Chimie des Matériaux
M. GOURDENNE	Chimie Physique
M. GRUAT	Mécanique
M. HOFFMANN	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. LABAT	Biologie et Biochimie Appliquée, Sciences Agronomiques
M. LEFEUVRE	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. LENZI	Chimie Appliquée et Chimie des Matériaux
M. MARTY	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. MASBERNAT	Mécanique
M. MATHEAU	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. MATHIEU	Chimie Analytique Appliquée et Chimie des Matériaux
M. MONTEL	Chimie Appliquée et Chimie des Matériaux
M. MORA	Génie Chimique
M. MORARD	Physiologie végétale appliquée
M. MORELIERE	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. MURATET	Génie Chimique
M. NOUGARO	Mécanique
M. TERRON	Zoologie et Ecologie
M. THIRRIOT	Mécanique
M. TRANNOY	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. TRUCHASSON	Mécanique
M. VOIGT	Chimie Minérale

A mes grands-parents

A mes parents

A mes frères et soeurs

A mon oncle et sa famille

Monsieur le Professeur HAMANT m'a accueilli dans son Laboratoire de Cytologie et de Pathologie Végétales de l'E.N.S.Agronomique de Toulouse. Il n'a cessé de m'encourager tant pendant ses dernières années d'exercice que depuis son départ à la retraite et a accepté de présider le jury de ma thèse. Je l'en remercie très respectueusement.

Monsieur le Professeur ALBERTINI, actuel Directeur du Laboratoire, a dirigé mon travail avec compétence et gentillesse. Je le prie de trouver ici l'expression de ma reconnaissance tant pour son riche enseignement que pour sa bienveillance.

Monsieur le Professeur MICHEL, Directeur du Laboratoire de Microbiologie Industrielle et de Virologie (U.E.R. Pharmaceutique de l'U.P.S.) et Monsieur le Professeur LABAT, Directeur du Laboratoire d'Ichtyologie de l'E.N.S.A.T., ont bien voulu participer au jury de ma thèse. Qu'ils trouvent ici le gage de ma gratitude.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur FREYDIER, Ingénieur d'Agronomie au Service de la Protection des Végétaux MIDI-PYRENEES qui a accepté de porter sur mon mémoire un jugement d'expert en matière de biologie des pathogènes et de lutte biologique.

J'exprime aussi toute ma gratitude à Monsieur SY, Docteur-Ingénieur, Assistant associé au Laboratoire de Cytologie et de Pathologie Végétales de l'E.N.S.A.T., pour son aide constante et efficace tant sur le plan matériel que sur celui de la théorie ; il a bien voulu me faire profiter de sa compétence dans le domaine de la lutte biologique : j'espère avoir bien mis à profit ses conseils éclairés.

Je remercie très cordialement Madame RENAUDIN et Monsieur GUERMOUCHE pour le soin particulier avec lequel ils ont mis en page et multiplié mon mémoire de thèse.

Mes remerciements chaleureux vont enfin à Madame DARDE et à tous mes camarades du Laboratoire pour l'ambiance amicale qu'ils ont su faire régner durant mon séjour parmi eux.

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE - CARACTERES DESCRIPTIFS ET BIOLOGIQUES DU *Botrytis cinerea* PERS. 5

CHAPITRE PREMIER - LA RELATION HOTE-PARASITE ET LE CYCLE DU PATHOGENE 7

1.1. - CONSERVATION ET PHASE CONTAMINATRICE 8

1.2. - SYMPTOMES OBSERVES 9

CHAPITRE DEUXIEME - ETUDE *in vitro* DE QUELQUES ASPECTS DE LA BIOLOGIE DU PATHOGENE 13

2.1. - ISOLEMENT ET PURIFICATION DE *B. cinerea* ; ETABLISSEMENT DE CULTURES MONOCONIDIENNES 13

2.2. - CARACTERES MORPHOLOGIQUES DE *B. cinerea* CULTIVE *in vitro* 15

2.3. - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DU PH SUR LE DEVELOPPEMENT VEGETATIF 17

2.3.1. - Action de la température sur la croissance mycélienne 18

2.3.2. - Action du pH sur la croissance mycélienne 20

2.3.3. - Action de la température et du pH sur la conidiogénèse 24

2.3.4. - Action de la température et du pH sur la germination des conidies 27

2.3.5. - Conditions optimales du développement végétatif du *B. cinerea* et conclusion 30

Pages

DEUXIEME PARTIE - RECHERCHE *in vitro* D'ANTAGONISTES DANS UNE PERSPECTIVE DE LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE *Botrytis cinerea* PERS. 32

CHAPITRE PREMIER - ACTION DE GERMES ANTAGONISTES SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE DU PARASITE 37

1.1 - MATERIEL ET METHODES 37

1.1.1. - Matériel biologique et conditions d'expérimentation 37

1.1.2. - Méthodes de confrontation directe de *B. cinerea* avec les germes antagonistes 38

1.1.3. - Méthodes de confrontation différée de *B. cinerea* avec les germes antagonistes 44

1.2. - RESULTATS DE L'ACTION DE GERMES ANTAGONISTES SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE DU PARASITE 46

1.2.1. - Etude de la croissance mycélienne des germes antagonistes efficients 46

1.2.2. - Analyse de la confrontation directe parasite-antagoniste efficient 51

1.2.3. - Analyse des confrontations différées 61

1.3. - CONCLUSION RELATIVE A L'ACTION DES GERMES ANTAGONISTES SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE DE *B. cinerea* 70

CHAPITRE DEUXIEME - ACTION DE GERMES ANTAGONISTES SUR LA GERMINATION DES CONIDIES DE *BOTRYTIS CINEREA* 73

2.1. - METHODES DE CONFRONTATION 74

2.1.1. - Préparation des suspensions condiennes de *B. cinerea* 74

Pages

2.1.2.- Préparation et utilisation du filtrat de culture d'antagoniste 74

2.1.3.- Préparation et utilisation de la suspension mycélienne de l'antagoniste 74

2.1.4.- Préparation et utilisation de la suspension conidienne de l'antagoniste 75

2.1.5.- Détermination des taux d'inhibition de germination des conidies de *B. cinerea* 75

2.2. - RESULTATS DE L'ACTION DE GERMES ANTAGONISTES SUR LA GERMINATION CONIDIENNE DE *B. cinerea* 77

2.2.1.- Action de filtrats de culture sur la germination 77

2.2.2.- Action de la suspension mycélienne d'un antagoniste sur la germination 77

2.2.3.- Action de la suspension conidienne d'un antagoniste sur la germination des conidies de *B. cinerea* 82

2.3. - CONCLUSION ET REMARQUES 87

2.3.1.- Conclusion relative aux différentes confrontations antagoniste-conidies de *B. cinerea* 87

2.3.2.- Conclusion relative au rapport entre la concentration conidienne de l'antagoniste et celle du parasite 87

2.3.3.- Remarque relative au pH du milieu 89

BILAN DES ACTIVITES ANTAGONISTES SUR LE MYCELIUM ET SUR LES CONIDIES DE *B. cinerea* 90

Pages

CHAPITRE TROISIEME - ACTION DES GERMES ANTAGONISTES SUR LA FORMATION ET SUR LA GERMINATION DES SCLEROTES DE *Botrytis cinerea* 92

3.1. - METHODES DE CONFRONTATION 94

3.1.1. - Utilisation du filtrat de culture antagoniste 94

3.1.2. - Utilisation du mycélium de l'antagoniste 95

3.2. - RESULTATS 96

3.2.1. - Résultats de l'action de germes antagonistes sur la formation des sclérotes 96

3.2.2. - Résultats de l'action de germes antagonistes sur la germination des sclérotes 101

3.3. - CONCLUSION 103

CHAPITRE QUATRIEME - ETUDES COMPLEMENTAIRES 105

4.1. - ACTION ANTAGONISTE COMPAREE A L'ACTION DE FONGICIDES EFFICIENTS CONTRE *B. cinerea* 105

4.1.1. - Expression numérique des résultats 105

4.1.2. - Discussion 106

4.2. - TEST *in vitro* DE COMPATIBILITE DES ANTAGONISTES AVEC LES FONGICIDES USITES EN VITICULTURE 107

4.2.1. - Expression numérique des résultats 107

4.2.2. - Discussion 108

4.2.3. - Remarque finale 108

4.3. - SYNTHESE 108

Pages

TROISIEME PARTIE - ESSAIS *in vivo* DE LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE *Botrytis cinerea* PERS. 110

CHAPITRE PREMIER - INFLUENCE DE TRAITEMENTS ANTAGONISTES SUR LA CONTAMINATION ARTIFICIELLE DE GRAPPES DE RAISIN PAR *Botrytis cinerea* 112

1.1. - PRELIMINAIRE 112

1.2. - EXPRESSION NUMERIQUE DES RESULTATS : DISCUSSION 113

CHAPITRE DEUXIEME - EXPERIMENTATION EN PLEIN CHAMP 115

2.1. - PRELIMINAIRE 115

2.2. - EXPRESSION NUMERIQUE ET GRAPHIQUE DES RESULTATS 116

2.3. - DISCUSSION 119

CHAPITRE TROISIEME - INCIDENCE DE L'APPLICATION *in vivo* DE TRAITEMENTS ANTAGONISTES SUR LA FERMENTATION DU MOUT 120

3.1. - PRELIMINAIRE 120

3.2. - RESULTATS 121

3.3. - DISCUSSION 122

DISCUSSION GENERALE 124

CONCLUSION GENERALE 133

BIBLIOGRAPHIE 138

PLANCHES DE PHOTOGRAPHIES (I à VII)

ANNEXE TECHNIQUE

INTRODUCTION

Botrytis cinerea Pers. est un parasite polyphage responsable, entre autres, de la "pourriture grise" des pommes, des poires, des fraises, du framboisier, de la laitue, du rosier et du figuier. Ce pathogène, qui présente une agressivité variable, par hétérocaryose et anastomose, se montre particulièrement redoutable sur vigne : après le mildiou, c'est lui qui cause le plus de dégâts au vignoble notamment au moment de la maturation des grappes. C'est ainsi qu'en Champagne, *B. cinerea* a été rendu responsable d'une perte moyenne de récolte de 25 % environ sur toute l'étendue du vignoble en 1978 (SIRIEZ, 1979).

Le pathogène passe l'hiver sous forme de sclérotes et/ou de mycélium libre sur les sarments. Mais aussi sur tout autre substrat végétal présent dans la vigne ou au voisinage de celle-ci car le *B. cinerea* est, rappelons-le, un champignon polyphage parasite et saprophyte. Du printemps à l'automne, il se manifeste sous forme active dans la quasi totalité des organes de la vigne :

- Les attaques foliaires ont lieu très précocément par temps humide et induisent la formation de fructifications de teinte gris foncé d'où le terme consacré de pourriture grise.

- L'affection précoce des inflorescences détermine l'apparition de bouquets de fleurs brunes.

- La pourriture pédonculaire se matérialise par un dessèchement partiel ou total de la grappe dont la chute est fréquente à l'approche des vendanges ; ce type d'affection peut provoquer des pertes de l'ordre de 30 à 40 %.

- L'attaque des grappes détermine en plus d'une chute de rendement (perte en jus, chute de grappes) une diminution de la qualité du vin par suite de la "casse brune" ou du "goût de pourri" à la vinification.

- On observe enfin que l'aoûtement des sarments attaqués est fortement compromis.

Depuis plus de dix ans, de gros efforts ont été déployés dans le domaine de la lutte chimique contre *B. cinerea* dans le vignoble. Plusieurs matières actives se montrent efficaces notamment des fongitoxiques de contact comme le procymidone, la vinchlozoline, l'iprodione, la dichlofluamide (cette dernière étant active aussi contre le mildiou et le black-rot) et, à un moindre degré, des fongicides systémiques du groupe des benzimidazoles /bénomyl, carbendazime (BCM), thiophanate-méthyl (GEOFFRION et GOIX, 1978 et Index Phytosanitaire, 1979)/. L'utilisation répétée des fongicides systémiques (notamment les benzimidazoles) favorise, dans les populations de *B. cinerea*, la sélection et l'accroissement relatif du nombre de souches résistantes à ces systémiques, vraisemblablement par hétérocaryose et anastomose (bénomyl, thiophanate-méthyl, thiabendazole, BOLLEN et SCHOLTEN, 1971 ; benomyl, POLACH et MOLIN, 1975, POURTOIS, MARAITE et MEYER, 1976 ; BCM, GEESON, 1976) : le facteur de tolérance n'est pas progressivement acquis mais préexiste (GEESON, 1976 ; POURTOIS et col., 1976). Rapidement notée, cette résistance génétique aux systémiques diffère de l'adaptation progressive du *B. cinerea* à des fongitoxiques de contact comme le sulfate de cuivre, le captane ou différents dithiocarbamates (PARRY et WOOD, 1958 a,b,c).

La polyphagie du *B. cinerea*, sa capacité à mener une vie saprophytique (par son mycélium) et à résister par des sclérotes à germination multiforme, sa capacité à émettre de nombreuses conidies aisément libérées et dispersées, font de cet organisme un parasite redoutable doué d'une grande capacité d'adaptation au milieu biologique et aux conditions météorologiques et d'une bonne aptitude à polluer les hôtes grâce à son intense sporulation. Dans ces

conditions, même si les traitements actuels en végétation au moyen de procymidone ou de vinchlozoline apparaissent assez satisfaisants contre la germination des conidies et non négligeables contre la croissance mycélienne du *B. cinerea*, ils ne doivent être considérés que comme des palliatifs car, d'une part, ces fongitoxiques de contact n'ont pratiquement pas d'action sur les formes de conservation et leur capacité à germer, d'autre part, l'apparition d'un phénomène de tolérance (analogue à ceux notés plus haut) du *B. cinerea* à l'égard de ces composés n'est pas à exclure dans un avenir plus ou moins proche bien qu'il n'ait pas jusqu'à présent été noté (LEROUX et GREDT, 1978).

A propos de lutte, parmi les voies de recherches qui s'ouvrent, celle concernant la lutte biologique m'a paru digne d'intérêt et je m'y suis engagé dans le but de mettre au point une méthode capable de compléter voire de remplacer à l'avenir celles de lutte chimique actuellement préconisées.

Contre un champignon pathogène, la mise au point d'une méthode de lutte biologique fondée sur les antagonismes fongique et bactérien, nécessite l'application d'une démarche méthodologique antérieurement définie au Laboratoire de Cytologie et de Pathologie Végétales de l'E.N.S.A.T. (SY, ALBERTINI et HAMANT, 1978 a) et que je rappelle :

1) recherche et détermination de germes inhibant *in vitro* la croissance mycélienne et/ou la germination sporale du pathogène (germes antagonistes du pathogène) ;

2) étude du comportement des germes antagonistes sur toutes les composantes de la biosphère ;

3) étude du (ou des) mécanisme (s) du (ou des) phénomène (s) d'antagonisme ;

4) application de l'antagonisme *in vivo* sur hôte contaminé par le pathogène ;

5) problèmes techniques et économiques posés par la mise en application agronomique de la méthode.

Dans le présent travail, j'étudie principalement le point 1 -essentiel- à savoir la sélection de germes fongiques capables d'inhiber la croissance mycélienne, la sporulation, la germination conidienne, la formation et/ou la germination des sclérotes du *B. cinerea* ; j'aborde aussi le point 4 à la lumière des résultats du point 1 et des données bibliographiques concernant les points 1, 2 et 3 (NEWHOOK, 1951 et 1957 ; WOOD, 1951 ; BLAKEMAN, 1972 ; BLAKEMAN et FRASER, 1971).

Mon travail se divise en trois parties :

1° partie : Caractères descriptifs et biologiques du *B. cinerea*.

2° partie : Recherches *in vitro* d'antagonistes fongiques dans une perspective de lutte biologique contre *B. cinerea*.

3° partie : Essais *in vivo* de lutte biologique contre ce pathogène.

PREMIERE PARTIE

CARACTERES DESCRIPTIFS ET BIOLOGIQUES DE

Botrytis cinerea Pers.

Botrytis cinerea Pers. est la forme imparfaite (Hyphomycètes, Moniliacées) couramment rencontrée de l'Ascomycète *Sclerotinia fuckeliana* (de Bary) Fuckel = *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz (Hélotiales, Sclérotiniacées). Au cours de son cycle, le pathogène différencie des sclérotes qui en fonction des conditions de maturation et/ou de milieu peuvent être mycéliogènes, carpogènes ou le plus souvent sporogènes.

Pour mettre au point une méthode de lutte biologique contre *B. cinerea*, il est essentiel de bien appréhender au préalable quelques points essentiels de la biologie du pathogène, tel est le but de cette première partie. Pour ce faire, après avoir noté dans un 1° chapitre, les principaux traits de la relation hôte-parasite en m'appuyant sur des données bibliographiques, j'analyse, dans un 2° chapitre, la croissance mycélienne, la sporulation et la germination conidienne en fonction de différents facteurs abiotiques (essentiellement température et pH) ; quelques considérations sur la formation et la germination des sclérotes achèvent ce second chapitre.

CHAPITRE PREMIER

LA RELATION HÔTE-PARASITE ET LE CYCLE DU PATHOGENE

B. cinerea, champignon polyphage, peut s'attaquer à de nombreux végétaux sur lesquels il occasionne régulièrement la pourriture grise ; de nombreux cépages de vigne sont sensibles au pathogène.

1.1. - CONSERVATION ET PHASE CONTAMINATRICE

B. cinerea se conserve facilement d'une année à l'autre sur des supports végétaux morts où il se développe à l'état de saprophyte et où on le trouve de façon permanente.

- En hiver, on peut notamment l'observer sous la forme de scléroses ou de mycélium libre sur les ceps de vigne, les rameaux et les feuilles mortes.

- Au printemps, dès que les conditions de milieu sont favorables, le mycélium et les scléroses entrent en phase active. Par temps humide, dès le mois de mai, ils fructifient et libèrent leurs spores : le mycélium et les sclérotes produisent des conidies, les sclérotes étant capables en outre de produire par germination des apothécies porteuses d'ascospores. Les conidies sont principalement dispersées par le vent mais aussi par la pluie, cette dernière favorisant plutôt leur libération. En présence d'humidité, les conidies germent et donnent à leur tour naissance à un tube mycélien qui pénètre dans la plante.

De nombreux auteurs ont étudié les modalités de pénétration du champignon dans l'hôte. Une pénétration directe à travers la cuticule a été observée par WILSON (1937) sur feuille de fève et par AINSWORTH (1938) sur feuille de tomate. PAUL (1929) indique, chez le lilas, une pénétration du champignon dans les stomates. NELSON (1951) constate que *B. cinerea* pénètre de préférence par les blessures dans les grains de raisin.

Une expérimentation systématique a été effectuée par LOUIS (1963) sur différents végétaux (*Vicia faba, Lycopersicum esculentum, Allium cepa, Cyclamen persicum, Pelargonium peltatum, Fuchsia globosa, Hydrangea hortensia, Syringa vulgaris, Fragaria* sp.) par utilisation de différentes souches de *B. cinerea*. L'auteur note que chèz la feuille de fève ou le jeune fruit de tomate, la formation d'une nécrose est due à la pénétration, à travers la cuticule moyennement épaisse, d'un seul filament germinatif. Lorsque la cuticule est plus mince (pétales de cyclamen et de géranium, feuille de fuchsia) la formation de la nécrose résulte de nombreuses pénétrations. La pénétration ne se produit par les stomates que sur feuilles de fève et de dahlia. L'auteur a, en outre, déterminé que les amas mycéliens ont un pouvoir contaminant plus élevé que les spores et souligné que le *B. cinerea* pénètre et se développe beaucoup plus facilement à l'endroit d'une lésion qu'elle soit naturelle ou provoquée. VERHOEFF et WARREN (1972) ont étudié, *in vitro* et *in vivo* la dégradation de la paroi cellulaire de plants de tomate par l'action enzymatique du *B. cinerea*. Ces auteurs ont montré que *B. cinerea* produit des enzymes pectolytiques et cellulolytiques et que la quantité de ces différents enzymes varie en fonction du développement mycélien dans le tissu parasité. Toujours chez la tomate, SHISHIYAMA, ARAKI et AKAI (1970) ont observé une action cutinolytique du mycélium de *B. cinerea*. Par conséquent en confirmation des observations morphologiques, il y a tout lieu de penser que les enzymes pectolytiques, cellulolytiques, cutinolytiques sont produites aussi par les tubes germinatifs (mycéliens) émis par les conidies favorisant ainsi la pénétration directe du pathogène.

1.2. - SYMPTOMES OBSERVES

Attaquée par *B. cinerea*, la vigne présente différents symptômes :

- Symptômes sur feuilles

La maladie apparaît d'abord sur les feuilles, fréquemment avant floraison. Elle provoque la formation de taches brun acajou disposées parfois dans le limbe médian, le plus souvent à la périphérie foliaire où elles sont disposées de part et d'autre d'une grosse nervure. Elles sont fréquemment de forme plus ou moins triangulaire, la partie la plus large se trouvant sur les bords du limbe. Au cours des printemps humides, leur face inférieure, à la limite des tissus sains, se couvre d'efflorescences grises. Dans la majorité des cas, leur présence n'a pas de conséquences sérieuses. Le champignon peut également se développer sur les pousses herbacées et provoquer des dégâts bénins (GEOFFRION et GOIX, 1978).

- Symptômes sur jeunes inflorescences

Les jeunes inflorescences, avant anthèse, peuvent présenter des bouquets de fleurs brunies. L'infection par le champignon peut procéder à partir d'une bractée d'inflorescence ou de grappe ainsi que d'une glande perlée. Attaquée précocément, l'inflorescence se dessèche souvent entièrement.

Sur les inflorescences, les tordeuses de la grappe (*Cochylis* ou *Eudemis*) forment, lors de leurs premières générations, des glomérules pouvant être infectés par *B. cinerea*. En particulier, les sépales inclus dans ces glomérules sont aisément colonisés par le pathogène et servent de relais privilégiés à partir desquels sont attaqués les tissus sains de la grappe.

A la pleine floraison, des bractées de bouquets floraux peuvent être envahies par le champignon. En fin de floraison, le capuchon de la fleur constitué de sépales, au lieu de tomber comme cela se produit normalement, peut rester collé à celle-ci et pourrir à la suite de l'infection par *Botrytis* : à partir du capuchon colonisé, il peut y avoir une infection totale du grain qui se développe sous ce capuchon.

L'inoculum parasite présent dans le suc stigmatique semble aussi jouer un rôle important dans l'infection au moment du phénomène de fécondation ; en outre, les étamines sénescentes parfois encore visibles au contact des jeunes baies - étamines souvent souillées par *B. cinerea*- constituent une source d'infection pour leur support.

N'omettons pas de dire que lors de la floraison, il peut se produire la coulure (physiologique ou due au froid) de certaines fleurs entrainant la persistance de débris floraux à l'intérieur de la grappe. Ces débris, dès que les pluies ou l'humidité sont suffisantes, sont contaminés par le *Botrytis* qui, de là, peut atteindre la rafle de la grappe (GÄRTEL, 1977).

En conclusion, soulignons que lorsque les conditions climatiques sont très favorables au développement du pathogène, les jeunes grappes se révèlent très fragiles notamment avant leur floraison : elles se flétrissent puis se dessèchent brutalement, se désarticulent et leur extrémité se recourbe fréquemment en crosse.

- Attaque des grappes

A un stade plus avancé, les dégâts sur grappe deviennent habituellement plus graves. En effet, si les conditions lui sont favorables, le *B. cinerea* peut provoquer la pourriture des grappes. Le grain de raisin atteint se couvre d'une tache diffuse qui s'étend rapidement en surface et en profondeur ; il perd son aspect brillant et tend à brunir. Le caractère le plus net de l'attaque est le pourrissement du grain (pourriture sèche) dont la pulpe est profondément altérée (ce qui compromet la vendange tant en quantité qu'en qualité) ; le grain s'allonge tandis que des rides profondes apparaissent. Au cours de cette phase de pourrissement, le grain s'est recouvert de l'efflorescence grise caractéristique très riche en conidies de propagation, la sortie des conidiophores se faisant par effraction cuticulaire consécutive à l'accumulation du mycélium sous-jacent ou à la formation au niveau pelliculaire de petits

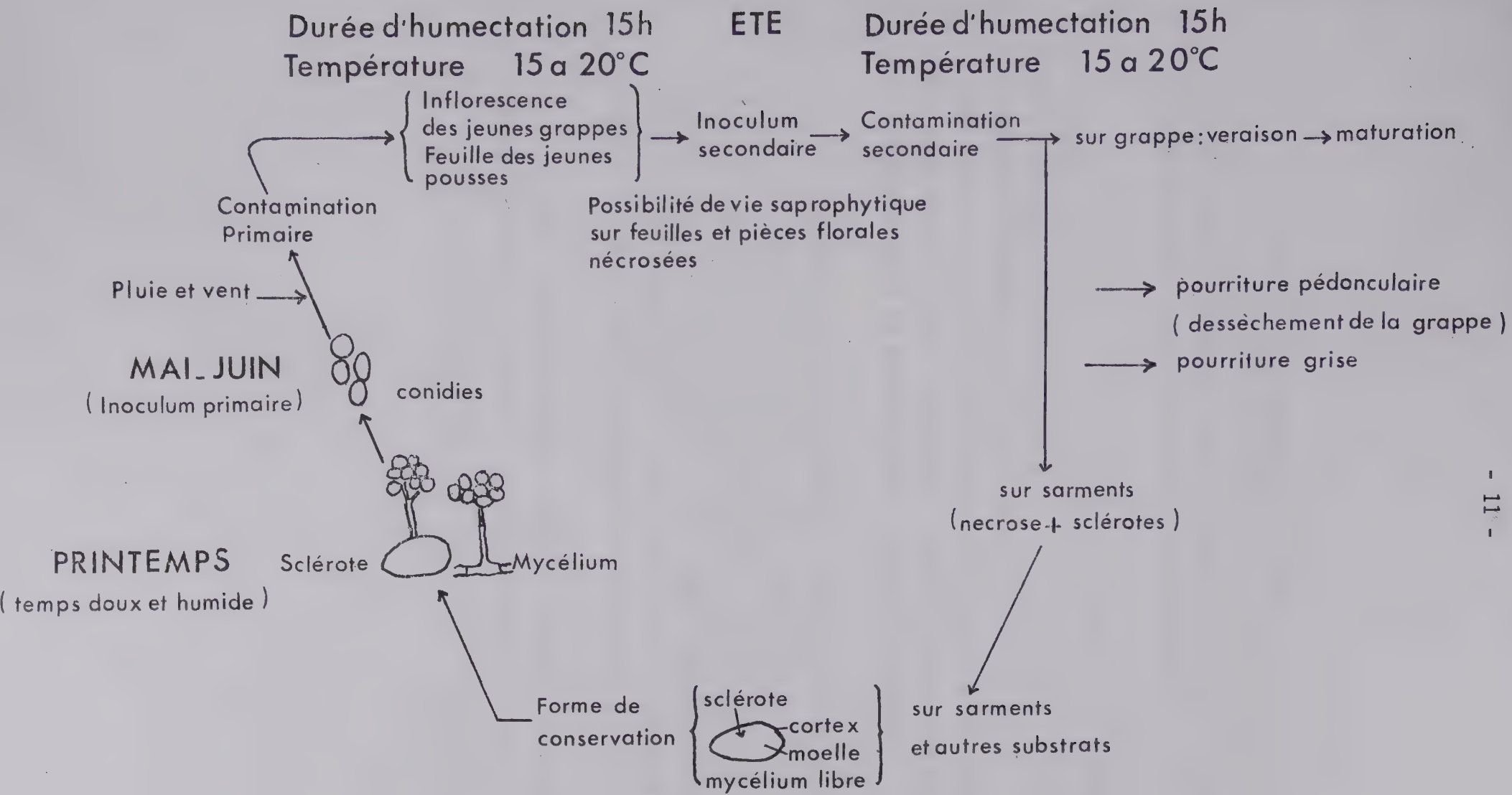


Fig. 1 Cycle de Botrytris cinerea Pers. sur vigne

organes sporogènes de type sclérotique. L'épiderme de la baie se lacère alors et celle-ci laisse écouler son contenu : d'autres cryptogames et des bactéries activent ensuite la décomposition de la baie. Les grains à cuticule mince sont relativement plus attaqués que ceux à cuticule épaisse.

Sur les raisins blancs dont la récolte se fait tardivement, tels que les Sauternes, l'action du *B. cinerea* apparaît, en revanche, bienfaisante car elle provoque la concentration des oses par dessèchement partiel des grains ; en outre elle diminue la proportion des acides et des tanins. Le goût des vins ainsi obtenu est modifié en bien grâce à une fermentation ralentie : ce goût est assez estimé ce qui a fait donner le nom de "pourriture noble" au *B. cinerea* quand il se manifeste dans de telles conditions.

Lorsque la rafle est atteinte, ce qui se produit assez souvent peu avant la vendange, on observe tout d'abord des nécroses de faibles dimensions au-dessous des amas mycéliens contaminateurs. Ces nécroses deviennent confluentes et entrainent la pourriture humide de la rafle par altération, par le pathogène, des tissus sous-jacents et perméabilisation de la cuticule (GÄRTEL, 1977). Cette pourriture dite pédonculaire entraine un flétrissement de la grappe qui peut même se désarticuler et tomber sur le sol.

Enfin, les sarments déjà altérés ou non par le mildiou peuvent être l'objet d'attaques ; l'aoûtement est alors compromis et sur leur écorce, mais aussi parfois dans la moelle, se forment des petits organes noirs (en relief sur l'écorce) : ce sont les sclérotes, organes de conservation de la maladie.

CHAPITRE DEUXIEME

ETUDE *in vitro* DE QUELQUES ASPECTS DE LA BIOLOGIE DU PATHOGENE

2.1. - ISOLEMENT ET PURIFICATION DE *B. cinerea* - ETABLISSEMENT DE CULTURES MONOCONIDIENNES

Etant donné la variabilité de *B. cinerea*, il est nécessaire d'obtenir des cultures monoconidiennes dont le comportement est moins sujet à variation que les populations initiales dont elles sont issues.

Les échantillons malades (grappes de raisin) proviennent de différents cépages (Gamay, Mauzac et Cabernay) récoltés à Monlon (Toulouse) et à Fronton en Septembre 1976.

Isolement et purification

A l'aide d'une pince préalablement désinfectée, un fragment de mycélium de *B. cinerea* est prélevé pour être déposé directement sur un milieu nutritif gélosé en l'occurrence le PCA (voir composition du PCA en Annexe Technique § A1). L'opération est répétée quinze fois. Les 15 cultures ainsi réalisées sont alors incubées à 20° $\pm$ 0,5° C pendant 4 jours. Par repiquage du mycélium jeune situé à la périphérie de ces cultures à croissance rapide, on a de grandes

chances d'obtenir des cultures pures. De telles cultures peuvent cependant être souillées par des germes bactériens prolifiques provenant de l'inoculum initial. Pour éliminer de tels germes, plusieurs méthodes (le recours aux antibiotiques, la méthode de VOLKONSKY (boîte de Petri à couvercle gélosé et retournée), la méthode de RAPER à l'anneau de verre) ont été appliquées ; parmi celles-ci, la technique de RAPER m'est apparue la plus satisfaisante : c'est un procédé physique de purification très efficace et simple.

Etablissement de cultures monoconidiennes

A partir de chaque culture pure, une suspension conidienne mère est réalisée dans de l'eau distillée stérile ; puis par dilution successive est obtenue une suspension conidienne contenant environ 1.000 conidies/ml. Cette concentration permet, à l'aide d'une pipette Pasteur, de déposer sur une lamelle stérilisée 4 à 5 microgouttes ne renfermant qu'un nombre très réduit de conidies à défaut d'une seule.

Le dénombrement des conidies présentes dans une microgoutte se fait au microscope, le dessèchement de la microgoutte étant évité par l'usage d'une chambre humide de VAN TIEGHEM préalablement stérilisée.

Après avoir été bien repérées, les microgouttes ne renfermant qu'une seule conidie sont individuellement captées par capillarité à l'aide d'un triangle de papier filtre stérilisé ; le fragment de papier filtre ainsi chargé d'une conidie est aseptiquement déposé à la surface du substrat nutritif (PCA) en boîte de Pétri mise alors à incuber à 22° C.

Dans mon travail, trois souches monoconidiennes, isolées à partir de grappes de raisin atteintes de *B. cinerea*, ont été principalement étudiées : deux de ces souches (S_1 et S_2) proviennent du vignoble de MONLON (E.N.S.A. de Toulouse), la troisième (S_3) d'une vigne du Frontonnais (Haute-Garonne). Une 4e souche (S_4) provenant de BAARN (Pays-Bas) a été expérimentée par comparaison dans un certain nombre de tests.

2.2. - CARACTERES MORPHOLOGIQUES DE *B. cinerea* cultivé *in vitro*

En conformité à la règle quasi générale notée chez les champignons cultivables *in vitro* , l'aspect et l'intensité de la croissance des colonies de *B. cinerea*, obtenues à l'obscurité sur PCA, varient en fonction de la température et du pH du milieu (j'analyserai bientôt ces points en détail).

Au microscope, le mycélium obtenu sur PCA (à 22° C et à l'obscurité) montre un diamètre variable. Les hyphes jeunes (cloisonnées) sont généralement hyalines, grêles (4 à 6 µm de diamètre moyen) alors que les filaments plus âgés sont épais (8 à 13 µm de diamètre moyen), brunâtres à olivâtres (par leurs cloisons colorées), parfois vésiculeux au niveau des septa. Bien ramifiées à pH 3,6 - 4,2 ou 4,6, les hyphes mycéliennes le sont peu à pH 5,6 ; le taux de ramification est quasi nul à pH 6,2.

Les conidiophores sont rapidement différenciés sur certains filaments mycéliens foncés. Large de 9 à 15 µm, un conidiophore (Fig. 2) est ramifié à son sommet ; il différencie alors des prolongements latéraux teintés, obliques ou perpendiculaires au rameau porteur, prolongements qui se terminent soit en pointe, soit le plus souvent en massue courte et peu teintée, porteuse de nombreux stérigmates. Long de 1 à 3 mm, chaque conidiophore apparaît comme un arbuscule, porteur à maturité, de nombreuses conidies elliptiques ou ovoïdes (8-14 x 6-9 µm), lisses, à paroi mince, hyalines à légèrement brunâtres. La plupart des conidies sont pourvues d'un hile légèrement protubérant, trace d'insertion sur le stérigmate.

Au bout de 10 à 12 jours sur PCA (à 22° C, à l'obscurité), les conidiophores, différenciés en grand nombre dans la culture, constituent un feutrage gris cendré à gris brunâtre, aérien qui revêt la colonie fongique (moisissure grise).

En culture *in vitro* sur PCA (à l'obscurité), les primordia des sclérotes apparaissent le 6^{e}-7^{e} jour à 22° C, le 12^{e} jour à 15° C. D'abord blancs

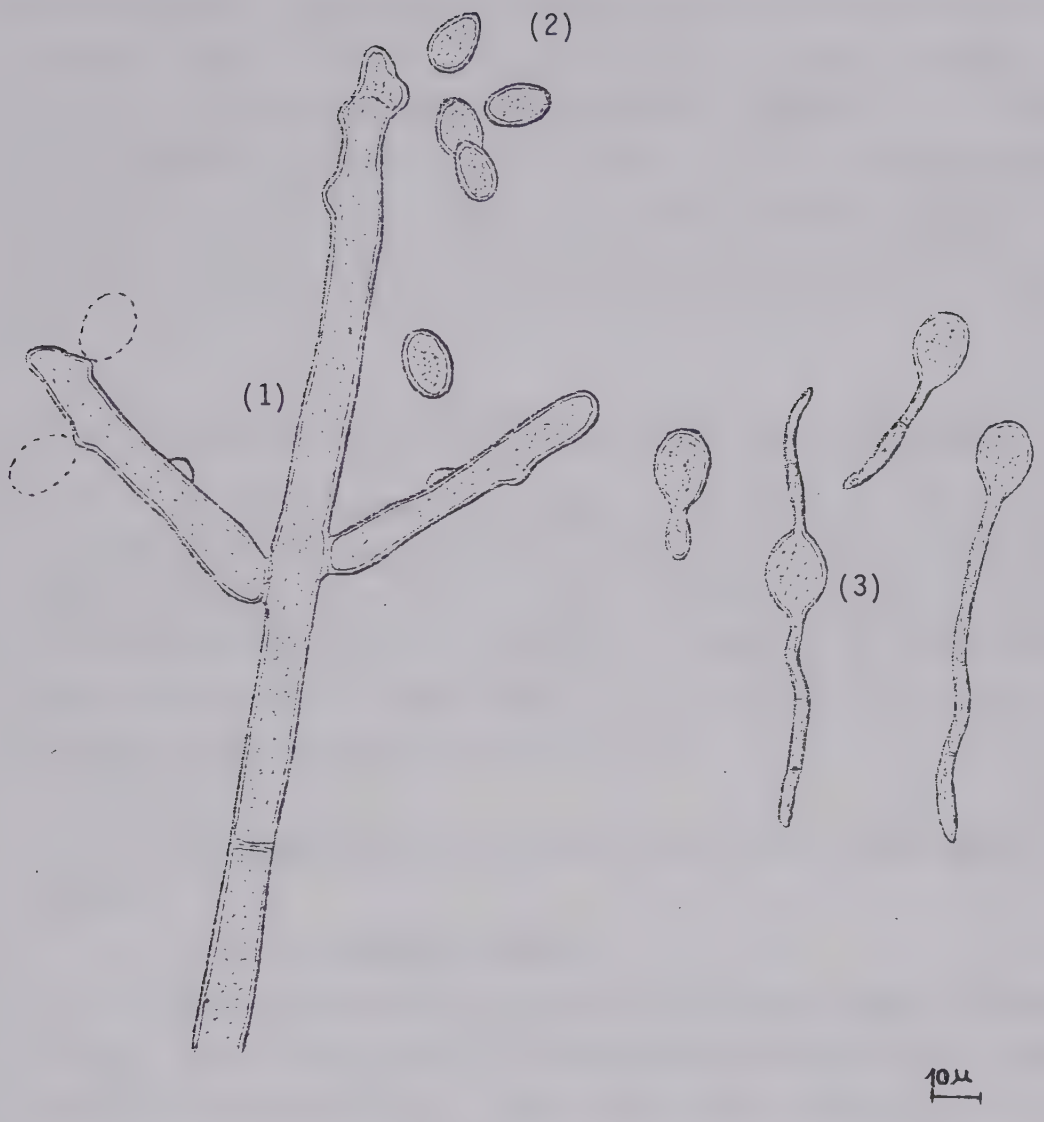


Fig. 2 - *B. cinerea* (1) : condiophore
(2) : conidies
(3) : conidies en germination

puis jaunâtres, les sclérotes brunissent pour finalement devenir noirs quelques jours plus tard. De taille (0,5 mm à 5 mm) et de forme variable, les sclérotes mûrs de *B. cinerea* présentent trois couches distinctes : une enveloppe foncée à développement tardif, un cortex formé de cellules pseudoparenchymateuses à paroi mince et une moelle assez volumineuse constituée d'hyphes filamenteuses lâchement agencées (COLEY-SMITH et COOKE, 1971). La germination des sclérotes est le plus souvent conidiogène, beaucoup plus rarement carpogène.

2.3. - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DU pH SUR LE DEVELOPPEMENT VEGETATIF

Le développement de l'appareil végétatif et des organes reproducteurs des pathogènes est affecté par les facteurs de l'environnement (température, pH, humidité, milieu nutritif...) ; ainsi, à titre d'exemple, la pluie ou une humidité relative très élevée, un manque de lumière et de ventilation sont des facteurs favorables au développement de *B. cinerea*. Je me propose ici d'étudier l'action de la température et du pH.

Pour quantifier la croissance mycélienne, deux méthodes ont été retenues :

a) la méthode radiale

Elle est fondée sur la mesure du diamètre moyen (exprimé en mm) des colonies. Dans tous les cas, la moyenne indiquée représente la moyenne établie à partir de 5 boîtes de Pétri ; pour chaque boîte, la valeur affecté est la moyenne des mesures de 2 diamètres perpendiculaires.

b) la méthode pondérale

Son principe est de suivre, en fonction du temps, l'évolution de la masse sèche mycélienne, exprimée en mg ; pour ce faire la colonie fongique cultivée sur milieu liquide P.C. (voir Annexe Technique § A2) est filtrée sur papier filtre Durieux n° 111 qui retient le mycélium : celui-ci est ensuite séché à l'étuve à 105° C pendant 24 h et pesé. Dans tous les cas, la valeur moyenne mentionnée a été établie à partir de 3 mesures correspondant à 3 erlenmeyers.

2.3.1. - Action de la température sur la croissance mycélienne

a) croissance radiale (Fig. 3)

La Fig. 3 qui concrétise les résultats obtenus montre qu'il y a peu d'écarts entre les courbes obtenues pour les trois souches S_1, S_2 et S_3 sur PCA. Moyenne à 14° C, la croissance mycélienne est très active entre 20° C et 25° C avec un maximum proche de 22° C. A 30° C, la croissance est faible mais non négligeable. De tels résultats sont en concordance avec ceux obtenus par BROWN (1922).

b) croissance pondérale

Au bout de 12 jours d'incubation, le mycélium de teinte blanchâtre s'est, en fonction de la température d'incubation, plus ou moins développé dans et sur le milieu liquide PC comme en témoigne dans le tableau suivant l'indication des poids secs mycéliens.

Température	15° C	20° C	22° C	25° C	28° C
Poids sec en mg	77	99	101	97	89

Tableau 1 : Croissance pondérale mycélienne de *B. cinerea* (en poids sec mycélien pour 150 ml de milieu) en fonction de la température (souche S_3) ; 12 jours d'incubation à l'obscurité sur PC.

Comme la méthode radiale, la méthode pondérale me permet de noter que l'optimum thermique de croissance végétative de *B. cinerea* est proche de 22° C ; aisée entre 15 et 28° C, la croissance fongique s'effectue d'autant mieux que la température (20° C ; 25° C) se rapproche de l'optimum.

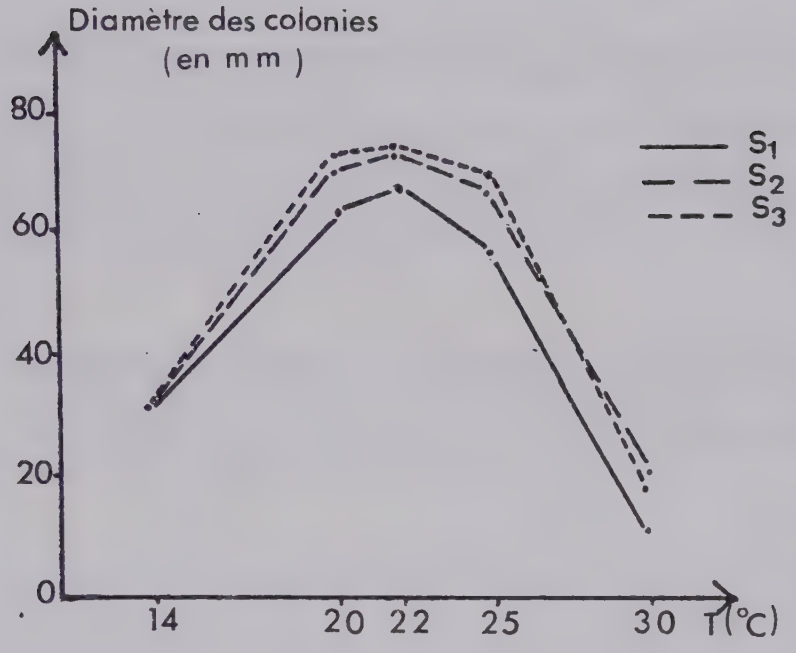


Fig. 3 - Croissance radiale des trois souches (S_1, S_2, S_3) de *B. cinerea* en fonction de la température ; 4 jours d'incubation sur PCA à l'obscurité.

2.3.2. - Action du pH sur la croissance mycélienne

L'incubation du parasite est réalisée à 22° C (température optimale de croissance), à l'obscurité, sur milieu à base de pomme de terre-carotte sous forme soit solide (PCA), soit liquide (PC). Les divers pH expérimentés (gammes de pH de 3,6 à 6,2 en milieu solide et de 2,8 à 7,2 en milieu liquide) sont obtenus par substitution à 20 % de milieu de base, de 20 % de tampon de MC ILVAINE (voir Annexe Technique § B) ; les pH initiaux (pHo) correspondent aux valeurs indiquées par le pH-mètre après autoclavage.

a) croissance radiale sur milieu solide PCA (fig.4)

Les courbes obtenues (fig.4) pour les 3 souches de *B. cinera* expérimentées ont sensiblement même allure générale ; la souche S_1 montre une croissance moins active que S_2 et S_3 notamment à pH 5,6. L'optimum de croissance des 3 souches se situe entre 4,0 et 4,6.

b) croissance pondérale évaluée en milieu liquide PC

Les valeurs numériques concernant la croissance en milieu liquide sont consignées dans les tableaux 2 et 3 suivants.

pHo	2,8	3,4	4,4	5,5	6,3	7,2
Poids sec en mg	44	169	288	169	95	80

Tableau 2 - Croissance pondérale mycélienne de *B. cinerea* (souche S_3) (en poids sec mycélien pour 150 ml de milieu PC) en fonction du pH initial (pHo) de culture ; 12 jours d'incubation à l'obscurité.

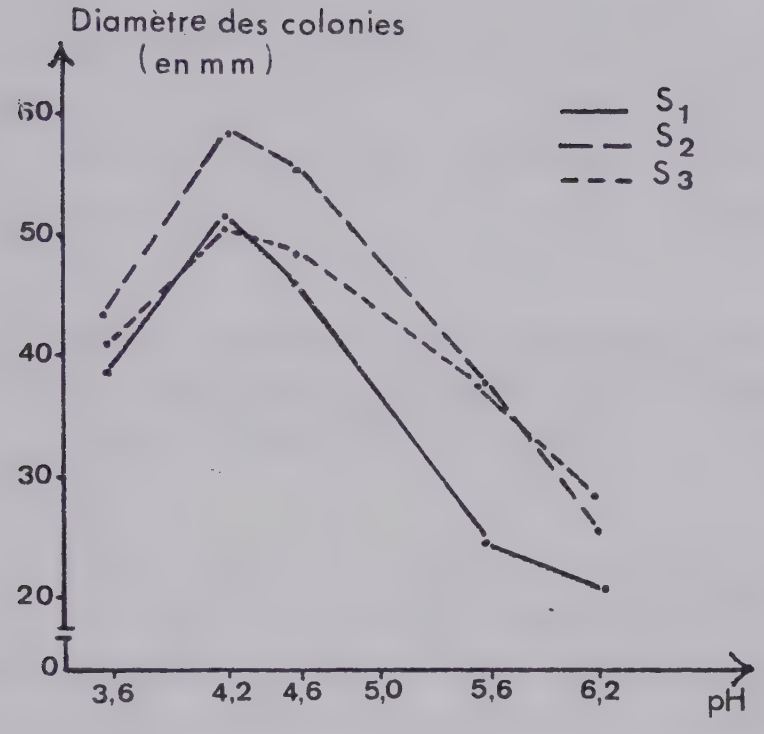


Fig. 4 - Croissance radiale des trois souches (S_1,S_2,S_3) de *B. cinerea* en fonction du pH ; 3 jours d'incubation sur pCA à l'obscurité.

Age des cultures (en jour)	8	15	20	26	31
pHo 4,4	107 (4,3)	267 (4,5)	347 (4,8)	416 (4,8)	365 (4,9)
pHo 5,5	52 (5,3)	220 (5,3)	258 (5,4)	297 (5,4)	316 (5,5)

Tableau 3 - Croissance pondérale en fonction du temps de la souche S_3 de *B. cinerea*, à pHo (pH initial) 4,4 et 5,5. Entre parenthèses, évolution du pH du milieu liquide PC.

En milieu liquide PC, l'optimum de développement mycélien (tableau 2) se situe à pH 4,4 ; pour les pH situés en-deçà de 3,4 au-delà de 5,5, la croissance fongique est faible. Il y a donc une assez bonne concordance entre les résultats obtenus par les méthodes radiale et pondérale : optimum de croissance à pH 4,0-4,5, développement très modéré au-delà de pH 5,3-5,5 et en-deçà de pH 3,5.

En milieu liquide, *B. cinerea* (S_3) forme aisément des conidies et des sclérotes dans une zone de pH comprise entre 3,4 et 5,5. A pH plus élevé (6,3 ; 7,2), la sporulation est faible, celle-ci étant quasiment nulle à pH 2,8 (j'aurai l'occasion de m'étendre sur ce point dans le 2.1.3.3. du présent chapitre).

Comparons à présent en fonction du temps la croissance pondérale fongique notée à pHo 4,4 à celle déterminée à pHo 5,5 (tableau 3). A pHo 4,4, la masse fongique, rapidement croissante au départ, passe par un maximum qui se situe vers le 24^e-25^e jour de culture, alors qu'à pHo 5,5, la croissance fongique, plus lente, se poursuit au-delà du 31^e jour de culture. A titre indicatif,

en 26 jours de culture, si le rendement en matière sèche est par convention noté 100 à pHo 5,5, il est proche de 140 à pHo 4,4.

Deux autres constatations peuvent être faites à la lecture du tableau 3 :

1) A pHo 4,4, entre le 26^{e} jour et le 31^{e} jour, la masse sèche mycélienne se réduit, mettant en évidence le fait que l'autolyse mycélienne l'emporte alors, dans cette culture vieillissante, sur la croissance.

2) A la différence des cultures effectuées à pHo 5,5 chez lesquelles le pHo ne varie pratiquement pas avec le temps (jusqu'au 31^{e} jour), les cultures effectuées à pHo 4,4 montrent une augmentation de 0,5 unité pH en 31 jours malgré la présence du tampon de MC ILVAINE.

Selon LILLY et BARNETT (1951), il semble qu'essentiellement les processus métaboliques suivants concourent à modifier le pH d'un milieu de culture : l'utilisation des anions et des cations par le champignon, la formation d'acides à partir de métabolites neutres (en particulier les sucres) et leur excrétion dans le milieu, la formation de bases (en particulier, NH_4OH) à partir d'aminoacides et de protéines et leur excrétion dans le milieu. La modification de pH constatée, pour pHo 4,4 serait la résultante des effets produits par les différents processus métaboliques qui accompagnent, d'une part, la croissance rapide du pathogène (anabolisme rapide, utilisation sélective d'ions et de métabolites provenant du milieu, excrétion), d'autre part, l'autolyse mycélienne précocément constatée : cette dernière qui se traduit notamment par l'excrétion de bases provenant du catabolisme des protéines fondamentales pourrait être la cause principale de la hausse du pH.

2.3.3. - Action de la température et du pH sur la conidiogénèse

De nombreux facteurs (température, humidité relative, lumière, période d'incubation, nombre de repiquages, pH, nature du substrat nutritif, etc...) influent sur la production d'organes de reproduction (multiplication asexuée notamment (voir, à titre d'exemple, les études de BERDUGO (1968), SY (1976), AL-ALI (1978) et SAR (1978), sur différents pathogènes). Concernant *B. cinerea*, j'ai observé une corrélation positive entre l'intensité de la sporulation et le taux d'humidité relative, sur grappillons inoculés ; à 100 % d'humidité relative, la conidiogénèse est très intense.

Nous savons, d'autre part (cf. KREBS, cité par BERDUCOU, 1957), que, de façon générale, les conditions favorables à une croissance luxuriante sont quelque peu défavorables à la prolifération d'organes de fructification ; par contre, la dessiccation des cultures, les variations subites de température, l'appauvrissement du substrat ou l'utilisation d'un substrat pauvre sont autant de conditions favorisant le phénomène de sporulation. Pour cette étude, j'ai donc retenu un milieu relativement pauvre (donc favorable à la conidiogénèse) capable en outre d'assurer un environnement très humide, convenable aux hyphes conidiogènes : il s'agit du milieu PC.

Sur mes cultures en milieu liquide (PC), l'intensité de la conidiogénèse a été déterminée par application de la technique suivante :

- la culture est rigoureusement agitée magnétiquement pendant 2 mn après adjonction d'une vingtaine de billes de verre ;

- dans le liquide homogénéisé, l'évaluation de la concentration conidienne se fait à l'aide de l'hématimètre de Malassez.

2.3.3.1. Action de la température sur la conidiogénèse

Les valeurs numériques sont consignées dans le tableau suivant :

Température	15° C	20° C	22° C	25° C	28° C
Nombre de conidies par ml	63.500	84.000	85.000	159.500	16.000

Tableau 4 : *B. cinerea* (S_3). Intensité de conidiogénèse en fonction de la température ; 10 jours d'incubation sur milieu PC à l'obscurité.

Le tableau 4 nous montre que la température la plus favorable à la sporulation est proche de 25° C. Notons que l'optimum thermique (22° C) de croissance mycélienne ne coincide pas avec celui plus élevé (25° C) concernant la conidiogénèse.

2.3.3.2. Action du pH sur la conidiogénèse et sur la morphologie des conidies

Le tableau 5 rassemble les valeurs numériques essentielles.

pHo	2,8	3,4	4,4	5,5	6,3	7,2
Nombre de conidies par ml	10.000	386.000	899.000	513.500	118.000	13.000
Longueur des conidies (en µm)		10,8 (± 0,4)	10,1 (± 0,3)	9,7 (± 0,3)	9,0 (± 5)	
Largeur des conidies (en µm)		8,1 (± 0,1)	7,9 (± 0,2)	7,7 (± 0,2)	7,2 (± 0,3)	
Nombre de conidies mesurées		85	85	85	85	

Tableau 5 - *B. cinerea* (S_3) - Influence du pH sur l'intensité de la conidiogénèse et sur les dimensions moyennes des conidies obtenues ; 12 jours d'incubation à 22° C sur PC, à l'obscurité. Les valeurs entre parenthèses désignent les intervalles de confiances (coefficient de sécurité 95 %).

Le pHo expérimenté le plus favorable à la sporulation est 4,4, le pH optimal étant vraisemblablement légèrement supérieur à cette valeur (de l'ordre de 4,6 à 4,8) (Tabl. 5). Remarquons en passant que les pH optima pour la croissance et la sporulation coincident sur ce milieu relativement pauvre.

La lecture du tableau 5 permet d'énoncer aussi que, dans les limites de pHo autorisant une bonne croissance mycélienne et une sporulation relativement abondante (3,4 à 6,3), les conidies sont d'autant plus longues et plus larges que le pHo est plus bas. Le phénomène est particulièrement remarquable, pour la longueur conidienne, celle-ci étant réduite de près de 20 % lorsque le pHo est plus élevé de 3 unités.

Notons que, chez nombre de formes conidiennes appartenant à l'ordre des Hyphomycètes, la morphologie conidienne est sous la dépendance du pHo (*Helminthosporium teres, H. sativum Coryneum beijerinckü, C. cardinale,* ALBERTINI, FADDOUL et BERDUGO, 1972 ; *Fusarium culmorum, Helminthosporium turcicum,* ALBERTINI, YOKA et MIAYOUKOU, 1974 ; *Bipolaris* spp., HOWARD, 1975 ; *Pyricularia oryzae,* SY, ALBERTINI et HAMANT, 1977). Il apparaît notamment de règle chez toutes ces espèces que les conidies sont d'autant plus longues que le pHo est plus bas ; cela est vrai aussi pour la largeur chez beaucoup d'espèces citées (*Helminthosporium* et *Bipolaris* spp., *C. cardinale*). Les conidies de *B. cinerea* se conforment à cette règle.

2.3.4. - Action de la température et du pH sur la germination des conidies

La germination des conidies est une phase importante du cycle pathogénique, chez les ascomycètes et les champignons imparfaits. Elle dépend, entre autres, de l'âge, de la perméabilité pariétale et des réserves sporales.

Chez *B. cinerea*, les conidies germent mieux au contact d'un tissu de plante sensible que dans l'eau distillée (BROWN, 1922). La germination est améliorée lorsque les spores se trouvent en contact avec un jus de plante (BLACKMAN et WELDSFORD, 1916 ; WOOD, 1951 ; GILLES, 1959). Elle est meilleure dans l'eau du robinet que dans l'eau distillée (LOUIS, 1963).

En outre, la germination des conidies est fortement liée aux conditions externes telles que la température, l'aération, la lumière, le pH, la concentration conidienne...

Le phénomène physiologique qu'est la germination révèle, selon COCHRANE (1958), trois manifestations successives :

- la turgescence
- la division nucléaire
- l'émission du tube germinatif.

Sous peine de demeurer partielle, notre interprétation devra tenir compte du taux global de germination et de la longueur du tube germinatif qui, d'une certaine façon, visualise la cinétique du phénomène.

Je me limiterai dans ce qui suit à l'étude de la germination des conidies de *B. cinerea* en fonction de la concentration conidienne, de la température et du pH.

2.3.4.1. Germination en fonction de la concentration conidienne (voir tableau 6)

Concentration en milliers de conidies par ml	100	200	300	400	500
Germination (%)	97	96	85	55	29

Tableau 6 - *B. cinerea* (S_3). Taux de germination des conidies en fonction de la concentration conidienne, au bout de 15 heures d'incubation dans l'eau distillée à 25° C, à l'obscurité.

Lorsque la concentration dépasse 300.000 spores/ml, le taux de germination conidienne de *B. cinerea* baisse considérablement (tableau 6) : au-delà de cette concentration, le phénomène d'auto-inhibition (ou self-inhibition) qui devient patent, augmente avec la concentration. La self-inhibition qui a été bien étudiée chez *Uromyces phaseoli* (YARWOOD, 1954, 1956), *Puccinia graminis tritici* (ALLEN, 1955) et *P. helianthi* (YARWOOD, 1956), est due, par exemple chez *P. graminis tritici*, à l'intervention d'un composé toxique thermostable, plus efficace à pH élevé et qui serait relativement inactivable par les sufaces de verre.

2.3.4.2. Influence de la température sur la germination conidienne (voir tableau 7)

Température	10° C	15° C	21° C	25° C	30° C
Germination (%)	87	93	95	88	48
Longueur moyenne (m) du tube germinatif (30 conidies)	17	24	55	65	29

Tableau 7 - *B. cinerea* (S_3) - Germination des conidies en fonction de la température (200.000 conidies/ml) ; 15 heures d'incubation dans l'eau distillée à 22° C, à l'obscurité.

La germination conidienne proprement dite est optimale dans la zone de température 15°-21° C ; cet optimum thermique est inférieur à celui qui concerne l'élongation des tubes germinatifs (tabl. 7).

2.3.4.3. Influence du pH sur la germination conidienne (voir tableau 8)

pH	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0
Germination (%)	93	98	96	91	72
Longueur moyenne (m) du tube germinatif (30 conidies)	137	203	159	146	58

Tableau 8 - *B. cinerea* (S_3) - Germination des conidies en fonction du pH ; mélange volume à volume de la suspension conidienne et du tampon de MC Ilvaine dilué au 1/10 (Concentration finale : 200.000 conidies/ml) ; 20 heures d'incubation à 22° C à l'obscurité.

Tous les pH expérimentés autorisent la germination des conidies (tabl. 8) ; celle-ci, relativement aisée dans l'intervalle de pH 3,0-6,0, est proche de son optimum à pH 4,0. Notons que le pourcentage d'émission des tubes et la longueur moyenne des tubes évoluent assez parallèlement en fonction du pH, autrement dit, germination proprement dite (émission du tube) et croissance mycélienne sont également sensibles à l'action du pH (tableau 8 ; voir aussi la fig. 3 concernant la croissance mycélienne). Cette constatation n'est pas dénuée d'intérêt car elle pourrait indiquer que contamination et expansion du pathogène nécessitent les mêmes conditions de pH.

2.3.5. Conditions optimales du développement végétatif du *B. cinerea* et conclusion

Les conditions optimales de la croissance mycélienne, de la conidiogénèse et de la germination conidienne de *B. cinerea*, telles que je les ai déterminées et indiquées dans le sous-chapitre 1.3. sont rappelés ci-après :

	Température optimale	pH optimal
Croissance mycélienne	22° C	4,0 - 4,6
Conidiogénèse	25° C	4,6
Germination conidienne	15° - 21° C	4,0

Rappelons encore que la concentration conidienne au-delà de laquelle le phénomène de self-inhibition devient net est de 200.000 conidies/ml environ.

Ces données biologiques seront donc prises en grande considération au cours de mon étude concernant l'action *in vitro* d'antagonistes fongiques et bactériens contre le *B. cinérea* (2e partie de mon mémoire) . Mais *B. cinerea* étant capable de manifester une action parasitaire en dehors des conditions optimales, de larges gammes de températures et de pH devront être expérimentées dans les confrontations pathogène-saprophytes. Il faut noter aussi qu'une forte humidité relative (95 à 100 %) est très favorable à la croissance mycélienne, à la sporulation et à l'infection de l'hôte.

L'importance des sclérotes dans le cycle pathogénique de *B. cinerea* a déjà été soulignée. On ne peut concevoir de lutte biologique véritablement efficiente sans étudier l'action d'antagonistes contre ces organes de résistance (essais d'inhibition de leur formation et de leur germination) : aussi, aurai-je l'occasion de préciser, entre autres, au cours de la 2e partie de mon mémoire, les conditions de formation et de germination des sclérotes.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHE *in vitro* D'ANTAGONISTES DANS UNE PERSPECTIVE DE LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE *Botrytis cinerea* PERS.

La colonisation des systèmes foliaire et radiculaire ainsi que des milieux qui leur sont associés (phyllosphère et rhizosphère respectivement) par les bactéries et les champignons ont fait l'objet de nombreuses recherches depuis 1950 (voir, par exemple, la revue bibliographique de BAKER et COOK, 1974). Certains des germes impliqués sont des parasites facultatifs ou obligatoires, d'autres sont saprophytiques, d'autres encore sont symbiotiques.

Sur feuille, la composition qualitative et quantitative de la microflore saprophyte varie suivant l'espèce de végétal, l'humidité, l'héméropériode, la température et les composés de sécrétion de la feuille (PREECE et DICKINSON, 1971). En particulier, la microflore caractéristique de la phyllosphère est soumise à des fluctuations météorologiques et elle varie suivant l'âge physiologique de la plante hôte ; ainsi, sur feuilles, le nombre de colonies est beaucoup plus important pendant la période de floraison en raison d'un apport de grains de pollen (FOKKEMA, 1968, 1971 ; DIEM, 1970).

JENKYN et PREW (1973) ont trouvé que les fongicides affectent, de façon différentielle, les bactéries, les levures et les *Clasdosporium* spp. du feuillage du blé, les auteurs notant, entre autres, que, traitées au bénomyl ou au thiophanate-méthyl, les feuilles de blé hébergent plus d'oïdium que lorsqu'elles ont été traitées à l'éthyrimol ou laissées sans traitement. Autre exemple : des feuilles de seigle porteuses de densités variables de germes saprophytiques et traitées ou non au bénomyl, sont soumises à une infection par *Cochliobolus sativus* juste avant floraison ; certains échantillons témoins présentent un nombre de nécroses inférieur de 60 % à celui des échantillons traités au bénomyl (FOKKEMA, VAN DE LAAR, NELIS-BLOMBERG et SCHIPPERS, 1975). Dans cet essai, le fongicide a donc détruit la microflore saprophyte normalement antagoniste du parasite.

Nous savons par ailleurs qu'au cours de la phase infectieuse, le végétal peut manifester une réaction de résistance par le biais d'inhibiteurs préexistants et connus sous le terme de phytoncides. Nous savons aussi que suite à l'infection, l'hôte peut fabriquer "de novo" des composés (phytoalexines) inhibiteurs à l'endroit où se localise le germe exogène.

Au-delà de ces données, on peut notamment affirmer qu'une microflore naturelle, présente sur les parties aériennes, telles que les fleurs, les fruits, les feuilles, les tiges, mais aussi dans le sol et à la surface du système racinaire, engendre un milieu fongistatique vis-à-vis de certains agents phytopathogènes (voir les revues bibliographiques de WOOD et TVEIT, 1955 et de BAKER et COOK, 1974). Force nous est donc de constater que dans la diversité de la flore fongique et bactérienne, il existe des espèces qui, de par leur comportement (hyperparasites de germes phytopathogènes ou producteurs de toxines antifongiques : voir les revues bibliographiques de WOOD et TVEIT, 1955 et de FOKKEMA, 1976) permettent d'envisager une forme de lutte biologique.

Pour ROGER (1951), l'action antagoniste de nombreux microorganismes résulte essentiellement de l'émission par ceux-ci de composés toxiques, thermostables ou non, qui diffusent dans le milieu ambiant ; ces composés agissent en inhibant partiellement ou totalement la croissance de microorganismes environnants.

Selon VAN DEN HEUVEL (1970), l'inhibition de croissance d'un champignon pathogène par un germe antagoniste est due, soit à l'action, sur le mycélium du parasite, de substances télétoxiques émises par l'antagoniste (action à distance), soit à un affrontement physique des deux colonies qui se sont rejointes (action de contact), soit à la conjonction de ces deux actions plus ou moins nettement exprimées.

FOKKEMA (1972) fonde l'action antagoniste exercée par des saprophytes à l'encontre du développement de champignons pathogènes :

1. sur la compétition concernant la nutrition,
2. sur la production de substances toxiques (antibiotiques...) par les saprophytes,
3. sur l'induction de synthèse de phytoalexine par l'hôte qui résiste ainsi mieux à l'agression.

Parmi les relations d'antagonismes dans lesquelles les champignons sont impliqués, deux sont particulièrement intéressantes dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes, à savoir :

. Les effets antagonistes de *champignons* sur les champignons phytopathogènes.

Exemples :

Trichoderma et *Gliocladium* spp. sont inhibiteurs de la croissance mycélienne et/ou de la sporulation de plusieurs phytopathogènes (BRIAN et HEMMING, 1945 ; BRIAN et MC GOWAN, 1945 ; WAKSMAN, 1948 ; TYNER et MC KINNON, 1964) ; *Trichoderma viride* est inhibiteur de *Pyricularia oryzae* (SY, ALBERTINI et HAMANT, 1978 a) et de *Rhizoctonia solani* (DAINES, 1937) ; *Gliocladium* sp., *Cephalothecium roseum* et *Sclerotium rolfsii* sont antagonistes d'*Helminsthosporium* spp. (PORTER, 1932 ; GREANEY et MACHACEK, 1935) ; un *Cephalothecium* est antagoniste de *Pyricularia oryzae* (YOSHII, 1950).

. Les effets antagonistes de *bactéries* dont plusieurs *actinomycètes*) sur les pathogènes.

Exemples :

Bacillus mesentericus et *B. mycoides* sont actifs contre *Helminthosporium* sp. (PORTER, 1932 ; CHRISTENSEN et DAVIES, 1940) ; *B. simplex* est actif contre *Rhizoctonia* sp. (CORDON et HAENSELER, 1939) ; *B. subtilis* est antagoniste de *Cephalothecium roseum* (ALEXOPOULOS, ARNETT et MC INTOSH, 1937).

Pseudomonas translucens et *P. vulgaris* sont antagonistes d'*Ophiobolus* sp. (BROADFOOT, 1933) ; *Pseudomonas fluorescens* inhibe la germination des spores de divers *Ustilago* tels que *U. avenae, U. hordei, U. nuda* et *U. maydis* (NAKHIMOVSKAIA, 1939).

Plusieurs Actinomycètes exercent une action dépressive sur le développement de pathogènes du sol (*Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, MITCHELL et ALEXANDER, 1962 ; *Streptomyces scabies*, VRUGGING, 1970) et sur la germination des conidies d'*Helminthosporium sativum* (STEVENSON, 1954). *Streptomyces* sp.

est actif contre divers agents responsables de la fonte des semis tels que *Pythium debaryanum* et *P. ultinum* (GREGORY et ALLEN, 1952) ; plusieurs espèces de *Nocardia* sont actives contre différents pathogènes (DOMMERGUES et MANGENOT, 1970).

Contre un champignon pathogène, la mise au point d'une méthode de lutte biologique, fondée sur l'antagonisme fongique, nécessite l'application d'une démarche méthodologique que j'ai rappelée dans l'Introduction de mon mémoire.

Dans la présente Deuxième Partie, j'étudie *in vitro* l'action antagoniste de différents champignons sur les phases essentielles du cycle de *B. cinerea*. Les points suivants sont successivement développés :

- Action de germes antagonistes sur la croissance mycélienne du parasite (Chapitre 1) ;

- Action de germes antagonistes sur la germination des conidies du parasite (Chapitre 2) ;

- Action de germes antagonistes sur la formation et la germination des sclérotes (Chapitre 3) ;

- Etudes complémentaires : action antagoniste comparée à l'action de fongicides efficients contre *B. cinerea*. Incidence de l'application d'antagonistes sur l'utilisation de produits de traitements contre d'autres pathogènes (Chapitre 4).

CHAPITRE PREMIER

ACTION DE GERMES ANTAGONISTES SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE DU PARASITE

1.1. - MATERIEL ET METHODES

1.1.1. - Matériel biologique et conditions d'expérimentation

Les 15 souches de champignons saprophytes, initialement essayés comme antagonistes (tableau 9), proviennent de la mycothèque de notre laboratoire.

J'ai déjà noté (1e partie, Chap. 2,3) que la croissance mycélienne de *B. cinerea* est maximale à 22° C et à pH 4,0-4,6 sur milieu PCA et que pour des valeurs de t (par ex. 14° C et 25° C) et de pH (par ex. 6,0 ; 7,0) s'écartant des valeurs optimales, la croissance mycélienne du parasite est loin d'être négligeable. Il est, d'autre part, connu que l'action inhibitrice d'antagonistes sur la croissance mycélienne de parasites varie en fonction de la température et du pH (SY, ALBERTINI et HAMANT, 1978 a). C'est pourquoi, il m'a paru nécessaire de mettre en confrontation le mycélium de *B. cinerea* avec celui de chacun des antagonistes testés non seulement à la température et au pH optimaux pour le pathogène, mais aussi dans des conditions éloignées des optima et qui cependant permettent un développement végétatif non négligeable du pathogène (par exemple, pour le criblage sélectif initial, la gamme de t retenues est la suivante : 14° C, 22° C, 25° C ; celle des pH : 4,4 ; 6,0 ; 7,0). Les cultures ont été effectuées à l'obscurité sur milieu PCA (pH désiré obtenu par addition de 20 % de tampon de MC ILVAINE en cours de préparation du milieu).

1.1.2. - Méthodes de confrontation directe de *B. cinerea* avec les germes antagonistes

1.1.2.1. Criblage sélectif

Le but du criblage sélectif a été de déceler, parmi 15 saprophytes initialement retenus, ceux qui inhibaient de manière très significative la croissance mycélienne de *B. cinerea* en fonction de la température et du pH. Pour économiser temps et matériel, le parasite a été confronté simultanément à quatre saprophytes dans une même boîte de Pétri de 100 mm de diamètre renfermant 30 ml de milieu PCA : l'inoculum de *B. cinerea* étant placé au centre de la boîte, ceux des autre antagonistes sont disposés en croix autour du parasite (chaque inoculum saprophyte étant à 24 mm de distance de l'inoculum parasite) (fig. 5). Précisons que les inoculums, prélevés sur des cultures en bonne végétation, sont constitués de disques de gélose de 4 mm de diamètre recouverts et pénétrés de mycélium.

Dans ce type de confrontation comme dans celui mettant en présence du parasite un seul saprophyte (voir 1.1.2.1.), l'inhibition de la croissance du parasite par un germe antagoniste est due, selon VAN DEN HEUVEL (1970), soit à l'action, sur le mycélium du parasite, de substances télétoxiques émises par l'antagoniste (action à distance), soit à un affrontement physique des deux colonies qui se sont rejointes (action de contact), soit à la conjonction de ces deux actions plus ou moins nettement exprimées (fig. 5). Il ne faut cependant pas perdre de vue le fait que le parasite peut en retour influencer la croissance du saprophyte antagoniste.

Dans la présente méthode de criblage, le niveau de l'inhibition produite par chacun des antagonistes sur la croissance du parasite est apprécié visuellement (tableau 9) ; il est en effet impossible de quantifier l'effet individuel d'un antagoniste sur le parasite quand quatre saprophytes agissent simultanément sur la même colonie du parasite. Les observations effectuées sur 5 boîtes de Petri (5 répétitions) d'un essai élémentaire garantissent la reproductibilité des résultats.

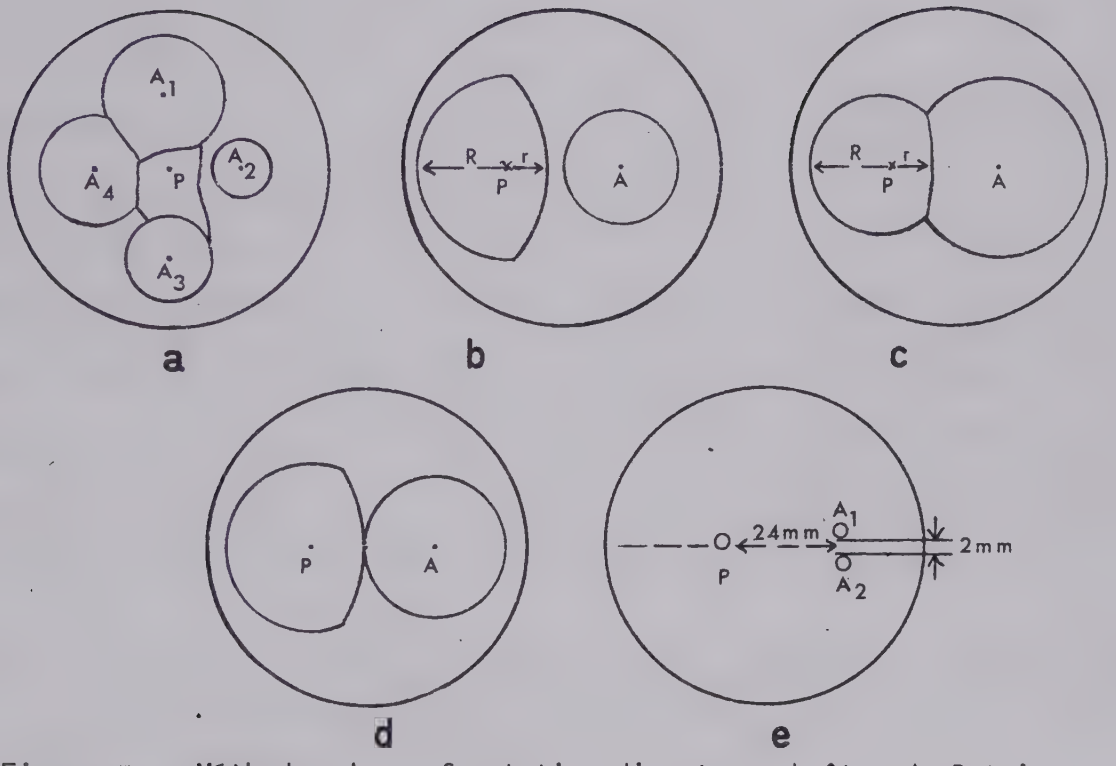


Figure 5 - Méthodes de confrontation directe en boîtes de Petri.

a = criblage sélectif ; les quatre champignons supposés antagonistes A_1, A_2, A_3 et A_4 sont disposés en croix autour de l'inoculum P de *B. cinerea*. Différents modes d'action sont exprimés dans le schéma : A_1 agit par contact, A_2 à distance, A_3 n'a pas d'action nette, enfin le mycélium de A_4 qui bloque par contact la croissance mycélienne de *B. cinerea* est réciproquement bloqué dans sa croissance par le mycélium de P (blocage mutuel).

b, c et d = confrontation des mycéliums du parasite P et d'un antagoniste A (b = action à distance ; c = action de contact ; d = action de contact et à distance).

e = dispositif adopté en vue de mettre en évidence une éventuelle synergie des actions antagonistes de A_1 et A_2 vis-à-vis de P.

Germes confrontés avec *Botrytis cinerea*	Principal mode d'action	Estimation des inhibitions bien exprimées
Alternaria dauci (Kühn) Groves et Skolko	C	C^{++} à 22° C et à 25° C (aux 3 pH)
Aureobasidium pullulans (DE Bary) Arnaud	-	
Chaetomium globosum Kunze ex Fr. (souche n° 1)	-	
Chaetomium globosum Kunze ex Fr. (souche n° 2)	-	
Epicoccum purpurascens Ehrenb. ex Schlecht (Extra)	C	C^{+} à 14° C (aux 3 pH) ; C^{++} à 22° C et à 25° C (aux 3 pH)
Fusarium lateritium Nees ex Fr. var. *majus*	C	C^{+} aux 3 t et aux 3 pH
Fusarium lateritium Nees ex Fr. var. *uncinatum*	C	C^{+} aux 3 t et aux 3 pH
Gliocladium roseum Bain	-	
Gonatobotrys simplex Corda	C,D	C^{+} à 14° C (aux 3 pH) ; C^{++} à 22° C (pH 4,4) et à 25° C (pH 4,4); D^{++} à 22° C et à 25° C (pH 5,0 et 7,0).
Gonatobotrym maculicola (Wint.) Sacc.	-	
Myrothecium sp. Tode (souche n° 1)	D	D^{+} à 14° C (aux 3 pH) ; D^{++} à 22° C et à 25° C (aux 3 pH)
Myrothecium sp. Tode (souche n° 2)	D	D^{+} à 14° C (aux 3 pH) ; D^{++} à 22° C et à 25° C (aux 3 pH)
Trichoderma viride Pers. ex S.F. Gray	C	C^{+} à 14° C (aux 3 pH) ; C^{++} à 22° C et à 25° C (aux 3 pH)
Trichoderma sp. Pers. (espèce a)	C	C^{+} à 14° C (aux 3 pH) ; C^{+++} à 22° C et à 25° C (aux 3 pH)
Trichoderma sp. Pers. (espèce b)	C	C^{+} à 14° C (pH 4,4 et 6,0) ; C^{++} à 22° C et à 25° C (pH 4,4 et 6,0)

Tableau 9 - Résultats du criblage sélectif initial en fonction de la température (14° C, 22° C, 25° C) et du pH (4,4 ; 6,0 ; 7,0) : le mycélium de *B. cinerea* a été confronté avec celui des 15 antagonistes expérimentés selon la méthode indiquée dans le texte (1.1.2.1.) (voir aussi Fig. 5 a). Observations effectuées après 6 jours d'incubation à 22° C ou à 25° C, après 8 jours à 14° C (cultures sur milieu PCA, à l'obscurité).

C = action de contact ; D = action à distance ; - = pas d'action significative
+ = action inhibitrice bien perçue
++ = forte action inhibitrice
+++ = très forte action inhibitrice
(ex. : C^{+++} très forte action de contact ; D^{++} = forte action à distance).

A la suite du criblage initial (tableau 9), quatre champignons saprophytes [*Myrothecium* sp. (souche n° 1), *Trichoderma viride*, *Trichoderma* sp. (espèce a), *Trichoderma* sp. (espèce b)] ont été retenus pour étude détaillée de confrontation avec trois souches de *B. cinerea* (S_1 et S_3 = origine : Monlon ; S_3 = origine : Fronton). Trois autres espèces (*Alternaria dauci*, *Epicoccum purpurascens* et *Gonatobotrys simplex*) à action antagoniste réelle mais moins affirmée que celle des autre premiers champignons cités, ont été l'objet d'expérimentation complémentaire limitée aux tests suivants :

1) confrontation parasite - un saprophyte en fonction du pH (tableau 10)
2) mise en évidence d'un éventuel effet de synergie par association d'antagonistes (tableau 11).

1.1.2.2. Confrontation directe saprophyte-parasite

Le mycélium de chacun des quatre champignons sélectionnés a été individuellement confronté au mycélium du parasite en fonction de la t et du pH. Dans une boîte de Petri de 100 mm de diamètre contenant 30 ml de milieu PCA, les deux inoculums (disques de 4 mm de diam.) sont disposés à 30 mm l'un de l'autre, symétriquement par rapport au centre de la boîte (Fig.5 b,c,d).

Le pourcentage d'inhibition I de la croissance radiale du parasite par l'antagoniste testé est déterminé par application de la relation de VAN DEN HEUVEL (1970) :

$$I\ (\%) = \frac{R - r}{R} \times 100 =$$

R étant le rayon de la colonie du parasite situé dans l'axe de symétrie de la culture à l'opposé de la colonie antagoniste et r étant le rayon de la colonie du parasite situé dans l'axe de symétrie de la culture, du côté de la colonie antagoniste (voir fig. 5 b,c).

Chacun des taux d'inhibition consignés dans les tableaux 10 et 11 est un taux moyen I (%) établi à partir des moyennes $\overline{R}$ et $\overline{r}$ des mesures effectuées dans 5 boîtes de Petri.

Antagonistes	Pourcentages d'inhibition I de croissance mycélienne radiale des souches S_1, S_2 et S_3 de *B. cinerea*					
	S_1		S_2		S_3	
	pH 4,4	pH 5,5	pH 4,4	ph 5,5	pH 4,4	pH 5,5
A. dauci	30	4	29	18	22	22
G. simplex	26	9	31	19	23	25
E. purpurascens	32	10	30	12	28	21
Myrothecium sp. (souche n° 1)	33	28	52	41	34	44
Myrothecium sp. (souche n° 2)	33	27	47	25	26	34
T. viride	37	22	39	37	38	32
Trichoderma sp. (a)	48	27	50	21	50	49
Trichoderma sp. (b)	43	34	50	40	49	39

Tableau 10 - Confrontation directe de chacune des souches retenues (S_1, S_2, S_3) de *B. cinerea* avec chacun des huit antagonistes retenus. Deux pH (4,4 et 5,5) ont été expérimentés ; milieu PCA, 22° C, obscurité.

Les inhibitions de croissance radiale I, déterminées au bout de 3 jours de culture, sont exprimés en pour cent de la croissance radiale normale (voir Matériel et Méthodes, 1.1.2.2.).

Mais dans un tel type de confrontation, le taux d'inhibition de la croissance en surface Is de la colonie parasitaire (Is étant exprimé en % par rapport au parasite témoin cultivé sans antagoniste) peut aussi être pris en considération. Je m'associe d'ailleurs à SY (1976) pour dire qu'il s'agit d'une détermination mieux représentative de l'action antagoniste telle qu'elle s'exprime globalement à l'encontre de la colonie du parasite : en effet, un antagoniste actif se manifeste assez rapidement soit à distance (par son action télétoxique) soit par contact (par suite d'une croissance rapide) non seulement dans la zone proximale de la colonie du parasite mais aussi dans les zones latérale et distale de celle-ci. C'est donc au moyen de Is (valeur moyenne calculée sur 5 à 10 répétitions) qu'ont été comparées, dans des expériences plus détaillées sur milieu PCA, les inhibitions de croissance de *B. cinerea* provoquées par les quatre antagonistes /*Myrothecium* sp. (souche n° 1), *Trichoderma viride*, *Trichoderma* sp. (espèce a), *Trichoderma* sp. (espèce b)/ classés en tête dans le criblage initial.

1.1.2.3. Recherche d'un effet de synergie

Dans le but de déceler un éventuel accroissement de l'effet inhibiteur par action synergique de couple d'antagonistes, j'ai effectué, en boîtes de Petri de 100 mm de diamètre, des confrontations parasite-saprophytes A_1 et A_2 en disposant le parasite P et les saprophytes A_1 et A_2 conformément aux indications de la Fig. 5 e. La distance séparant les inoculums de A_1 et A_2 étant faible (2 mm), si un effet de synergie se manifeste il doit, en principe, être particulièrement bien perçu selon l'axe de symétrie P-A_1A_2, c'est-à-dire selon r.

Le développement du parasite dans ces cultures P-A_1A_2 a été comparé à celui de cultures témoins P-A_1A_1 et P-A_2A_2 ; il y a normalement synergie si le taux d'inhibition déterminé pour A_1A_2 selon la relation de VAN DEN HEUVEL (1970) est supérieur aux taux de A_1A_1 et A_2A_2.

	A. dauci	*B. purpurascens*	*G. simplex*	*Myrothecium* sp. (n° 1)	*Myrothecium* sp. (n° 2)	*T. viride*	*Trichoderma* sp. (a)
. Dauci	28	40	36	34	34	50	56
. purpurascens		39	31	43	43	42	56
. simplex			37	36	32	55	58
Myrothecium sp. n° 1				61	32	38	62
Myrothecium sp. n° 2					30	38	63
. viride						59	64
Trichoderma sp. (a)							63

Tableau 11 - Confrontation mycélium de *B. cinerea* (S_3)-mycéliums de couple d'antagonistes A_1-A_2. Les inoculums du Parasite P, de A_1 et de A_2 sont disposés en boîte de Petri conformément aux indications de la Fig. 5 e (PCA ; pH 5,5 ; 22° C ; obscurité).

Le présent tableau à deux entrées présente les pourcentages d'Inhibition I (déterminés au bout de 3 jours) de la croissance radiale de *B. cinerea* (S_3) correspondant aux différents couples de saprophytes A_1-A_2 expérimentés ; la diagonale du tableau montre les inhibitions causées par A_1A_1 (ou A_2A_2). Il y a synergie lorsque I A_1A_2 > I A_1A_1 et I A_1A_2 > I A_2A_2.

L'effet synergique a été recherché à la température de 22° C, à pH 5,5, car dans ces conditions, le mycélium du parasite et celui des différents germes antagonistes actifs ont un développement convenable (Tabl. 11). Chacun des taux d'inhibition consignés dans le Tableau 11 est un taux moyen I (%) établi à partir des moyennes $\bar{R}$ et $\bar{r}$ des mesures effectuées dans 5 boîtes de Petri.

1.1.3. - Méthodes de confrontation différée (d) de *B. cinerea* avec les germes antagonistes

Dans une confrontation différée, le germe antagoniste n'agit que par ses dérivés métaboliques excrétés, aucun contact n'étant établi entre mycéliums.

1.1.3.1. Méthodes de confrontation différée (d) en milieu solide

a) méthode "à la cellophane"

Au départ, le milieu gélosé est tapissé stérilement en surface d'une feuille de cellophane (n° 600 du commerce) découpée à la dimension interne de la boîte de Petri. Le substrat ainsi préparé est inoculé en son centre par le germe antagoniste ; au bout de 72 h d'incubation à 22° C, à l'obscurité, la cellophane ainsi que la colonie antagoniste sont éliminés aseptiquement. L'inoculum du parasite est alors repiqué à l'endroit précis où se trouvait initialement l'inoculum de l'antagoniste.

Les inhibitions I et Is de la croissance radiale et en surface du parasite soumis à la confrontation différée sont évaluées en pour cent des croissances radialeset en surface des colonies témoins.

b) méthode du milieu solide enrichi en filtrat de l'antagoniste

Dans le but de connaître le niveau d'efficacité, de persistance et de stabilité à la chaleur, de la ou des substances émises par les germes antagonistes, j'ai procédé à la confrontation du parasite avec le filtrat de

germes antagonistes, à différentes concentrations (50 %, 25 %, 10 %), le filtrat ayant été préalablement autoclavé (30 mn à 104° C) ou non autoclavé.

Les filtrats des germes expérimentés [*Myrothecium* (souche n° 1), *Trichoderma* sp. (espèce a), *Trichoderma* sp. (espèce b)] ont été recueillis à partir de culture de ces antagonistes âgées de 8 à 15 jours (cultures en milieu liquide de RICHARDS, à 25° C, à l'obscurité).

Lors de la préparation du milieu solide, support de la confrontation, le pH a été laissé tel quel (il s'agit alors du pH essentiellement imposé par le filtrat de culture : voir le Tableau 16) ou ramené au moyen d'acide citrique (0,1 M) à une valeur de l'ordre de 4,5 autorisant une bonne croissance du pathogène.

1.1.3.2. Confrontation différée (d) en milieu liquide

Chaque antagoniste est individuellement cultivé en milieu de RICHARDS, à 25° C, à l'obscurité. Au bout de 8 jours de culture, le milieu dans lequel s'est développé un antagoniste est débarrassé de sa colonie fongique par préfiltration sur papier puis par filtration stérile sur membrane filtrante GELMAN (pores de 0,2 µm de diamètre), le liquide recueilli étant soit utilisé tel quel (filtrat brut : F.B.), soit dilué (F.D.) au 1/4, au 1/2 ou au 1/10 par addition de milieu de RICHARDS.

Chaque erlenmeyer destiné à la culture du parasite reçoit 50 ml de F.B. ou de F.D. avant d'être ensemencé par un disque de gélose de 4 mm de diamètre recouvert et pénétré de *B. cinerea* en bonne végétation (culture mère de 4 à 5 jours). Les cultures en milieu liquide ainsi réalisées sont placées à 22° C, à l'obscurité : au bout de 16 jours d'incubation, le contenu fongique de chaque erlenmeyer est recueilli, séché à l'étuve à 105° C et pesé. L'inhibition de la croissance mycélienne pondérale par l'action toxique de l'antagoniste est estimée en % par rapport au témoin. Dans le Tableau 16, chaque valeur

indiquée est un taux moyen d'inhibition obtenu à partir de 3 erlenmeyers contenant du F.B. ou du F.C. et de 3 erlenmeyers témoins.

1.2. - RESULTATS DE L'ACTION DE GERMES ANTAGONISTES SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE DU PARASITE

Je rappelle qu'à la suite du criblage initial (Tabl. 9), quatre champignons saprophytes [*Myrothecium* sp. (souche n° 1), *Trichoderma viride*, *Trichoderma* sp. (espèce a), *Trichoderma* sp. (espèce b)] ont été retenus pour étude détaillée de confrontation avec 3 souches de *B. cinerea* (S_1 et S_2 = origine : Monlon ; S_3 = origine : Fronton) et que trois autres espèces (*Alternaria dauci*, *Epicocum purpurascens* et *Gonatobotrys simplex*), à action antagoniste réelle mais moins affirmée que celle des quatres premiers champignons cités, ont été l'objet d'expérimentation complémentaire limitée.

1.2.1 - Etude de la croissance mycélienne des germes antagonistes efficients

La croissance de *Myrothecium* sp. (souche n° 1), de *Trichoderma viride*, de *Trichoderma* sp (a) et de *Trichoderma* sp. (b) a été étudiée en fonction de la température (Fig. 6) et du pH (Fig. 7) sur PCA.

La considération des Fig. 6 et 7 me permet d'énoncer que la vitesse optimale de croissance mycélienne de *Myrothecium* sp. (n° 1) est beaucoup moins élevée que celle des trois *Trichoderma*. Des quatre espèces étudiées, *Myrothecium* sp. (n° 1) est la plus thermophile ; en effet, bien qu'elle ne semble pas avoir un optimum thermique de croissance (30° C environ) supérieur à celui de *Trichoderma* sp. (a) et de *Trichoderma* sp. (b), elle subit, à 35° C, un ralentissement de croissance relativement moindre que celui des deux autres espèces à cette même température de 35° C = 26 % contre 80 % et 32 % respectivement pour *Trichoderma* sp. (a) et (b) (Fig. 6). A 14° C, alors que *Myrothecium* sp. (n° 1) est incapable de croître, les trois *Trichoderma* et notamment *Trichoderma* sp. (b) ont une croissance assez lente mais nette (Fig. 6).

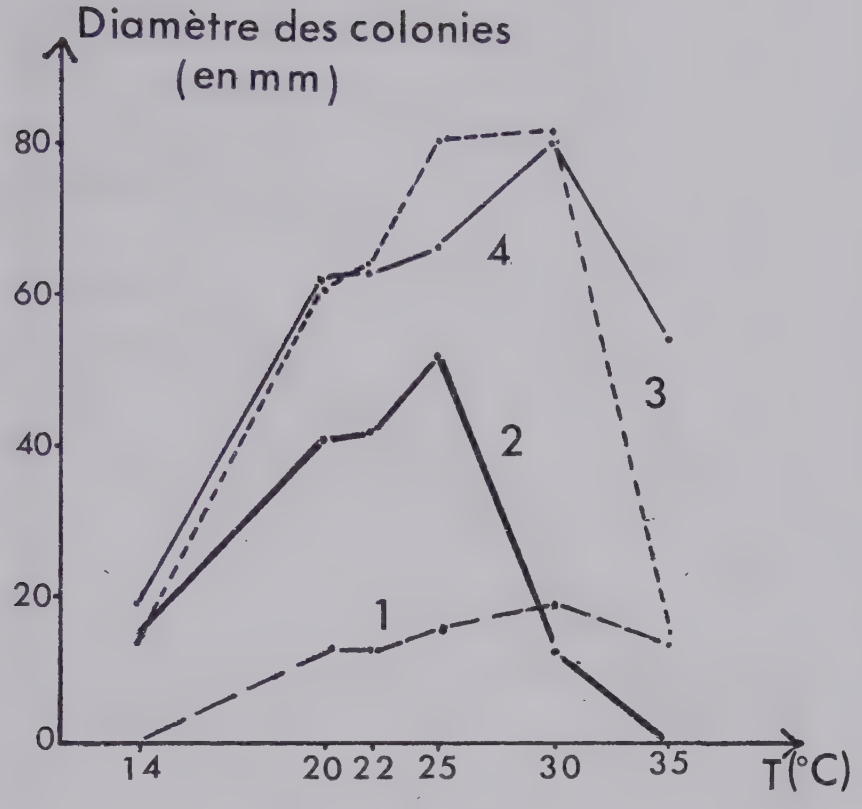


Figure 6 - Croissance radiale de *Myrothecium* sp. (souche n° 1) (1), de *Trichoderma viride* (2), de *Trichoderma* sp. (espèce a) (3) et de *Trichoderma* sp. (espèce b) (4) en fonction de la température (PCA ; pH 4,5 ; obscurité). Mesures effectuées au bout de 3 jours d'incubation.

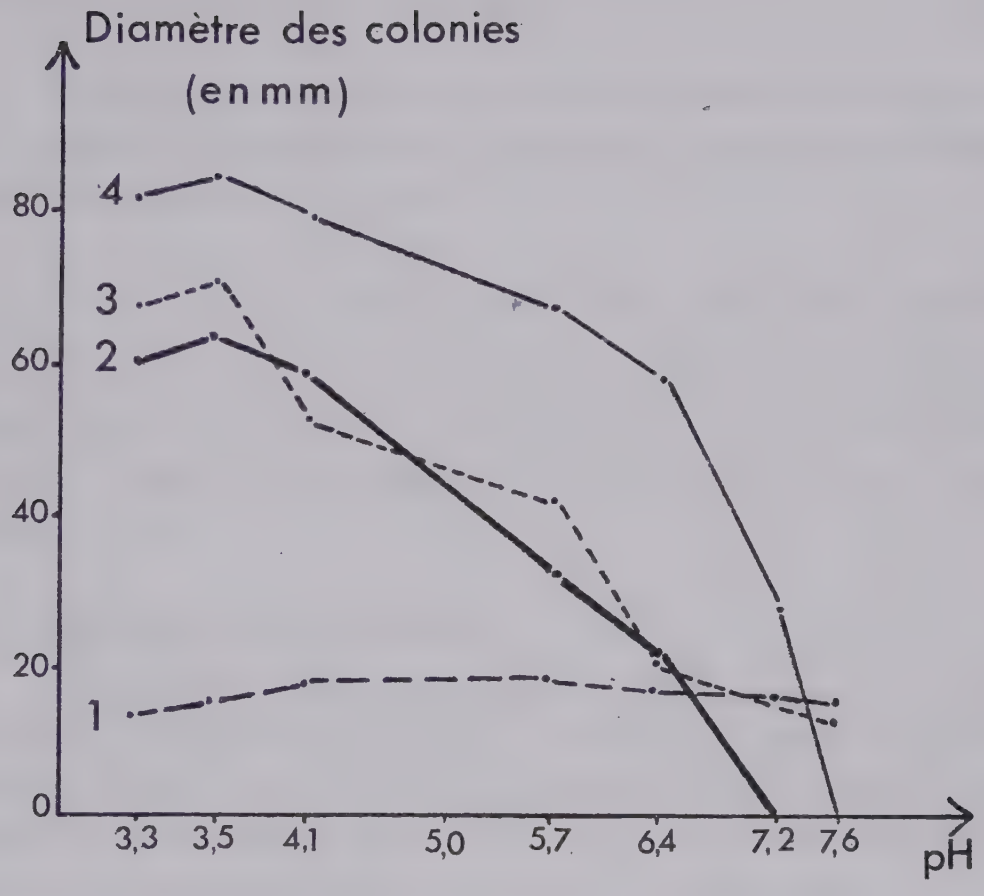


Figure 7 - Croissance radiale de *Myrothecium* sp. (souche n° 1) (1), de *Trichoderma viride* (2), de *Trichoderma* sp. (espèce a) (3) et de *Trichoderma* sp. (espèce b) (4) en fonction du pH (PCA ; 25° C ; obscurité). Mesures effectuées au bout de 3 jours d'incubation.

La considération de la Fig. 6 relative à la croissance des quatre antagonistes en fonction du pH m'autorise à énoncer les faits suivants :

- *Myrothecium* sp. (n° 1) peut être considéré, en première approximation, comme un antagoniste dont la croissance, faible, est indifférente au pH dans l'intervalle de pH 3,2-7,6.

- En revanche, la croissance des trois *Trichoderma* est fortement conditionnée par le pH : chez ces 3 organismes, la croissance mycélienne est une fonction nettement décroissante du pH. Les croissances mycéliennes de *T. viride* et de *Trichoderma* sp. (b) deviennent nulles respectivement à pH 7,2 et à pH 7,6 ; celle de *Trichoderma* sp. (a) devient relativement faible au-delà de pH 6 (Fig. 7).

Données complémentaires et remarques :

Aspect des colonies fongiques : Les trois *Trichoderma* ont, à t et à pH compris respectivement entre 20° C et 30° C, et entre 3,5 et 6,0, une croissance rapide ; leurs colonies de teinte blanchâtre homogène (parfois bleuâtre au centre chez *T. viride* à pH bas 3,3-4,1) sont constituées par du mycélium essentiellement aérien, fin, hyalin et assez dense.

Lorsque les conditions sont moins favorables (t : 14° C ou 35° C ; pH supérieur à 6,0), la croissance fongique est plus lente/ou nulle), le feutrage mycélien moins dense. Quant à *Myrothecium* sp. (n° 1), il différencie en général, dans les gammes de t et de pH étudiés, des colonies jaunâtres, à croissance lente, sur lesquelles se constituent bientôt un anneau formé de mycélium floconneux, dense, plus aérien et qui correspond à la zone de conidiogénèse.

Remarques : Notons que les quatre antagonistes retenus se développent bien, à 25° C, dans toute la zone de pH qui convient à la croissance mycélienne de *B. cinerea* (voir les Fig. 4 et 7). Remarquons en outre que le mycélium de

Myrothecium sp. (n° 1) ne croît pas (Fig. 6) à la basse température de (14° C) qui autorise une croissance modérée de *B. cinerea* (souches S_1, S_2 et S_3) (Fig. 3) et des 3 *Trichoderma* (Fig. 6). Or, il est connu que *B. cinerea* est capable de manifester une action parasitaire à 14° C et même à température plus basse (voir la synthèse bibliographique de BAKER et COOK, 1974) : en conséquence, l'action de saprophytes antagonistes doit, pour être efficace, pouvoir s'exprimer aussi à basse température ; or, cette action est conditionnée par l'aptitude du saprophyte au développement à basse température. Le thermophile *Myrothecium* sp. (n° 1) apparaît donc, *a priori*, handicapé à basse température mais demeure intéressant à étudier car il agit essentiellement à distance (Tableau 9) par émission antibiotique.

Dans le but de limiter l'expérimentation tout en lui conservant son caractère représentatif face au vaste champ d'investigation, à la suite du criblage initial (1.1.2.1. et Tableau 9) et de l'étude de la croissance des germes antagonistes que je viens de présenter, les conditions suivantes ont été retenues pour étudier l'action des antagonistes choisis sur la croissance mycélienne de *B. cinerea* :

1) température choisie : 22° C. Une telle température autorise une croissance active de tous les champignons (le parasite et les quatre antagonistes (Fig. 3 et 6).

2) deux pH expérimentés : le pH 4,4, très favorable au développement de tous les germes ; le pH 5,5, favorable au développement de *Myrothecium* sp. (n° 1) et de *Trichoderma* sp. (b) mais n'autorisant qu'un développement modéré de *B. cinerea* et des deux autres *Trichoderma* (Fig. 4 et 7).

1.2.2. - Analyse de la confrontation directe Parasite-Antagoniste efficient

1.2.2.1. Première étude : évaluation du taux de l'inhibition de croissance radiale (I) de *B. cinerea* exercée par les germes antagonistes efficients

Les principaux résultats des premières expériences de confrontation directe Parasite-Antagoniste qui ont succédé au criblage initial sont rassemblés dans les Tableaux 10 /confrontation directe Parasite-Un saprophyte sur milieu solide, à deux pH (4,4 et 5,5)/ et 11 (recherche d'un effet de synergie).

La considération du Tableau 10 me permet de noter que ce sont les trois *Trichoderma* /notamment *Trichoderma* spp. (a) et (b)/ et les deux souches de *Myrothecium* sp. (surtout la souche n° 1) qui présentent l'action antagoniste la plus nette vis-à-vis des trois souches de *B. cinerea*.

Je remarque, en outre, que parmi les antagonistes efficients, les trois *Trichoderma* agissant principalement par contact) inhibent mieux la croissance des trois souches du pathogène à pH 4,4 qu'à pH 5,5 : le pH 4,4, plus favorable à la croissance des trois *Trichoderma* que le pH 5,5 (Fig. 7), permet un encerclement plus rapide des colonies pathogéniques à croissance pourtant plus active à pH 4,4 qu'à pH 5,5 (Fig. 4). Quant à l'action inhibitrice de *Myrothecium* sp. (n° 1 et n° 2) (Tabl. 10), elle apparaît ne pas varier sensiblement dans l'intervalle de pH 4,4-5,5 ; les niveaux équivalents d'inhibitions (inscrits dans le Tableau 10) tels qu'ils ont été déterminés par la méthode radiale de VAN DEN HEUVEL (1970) semblent cependant rendre compte d'une télétoxicité de *Myrocethium* sp. (n° 1 et n° 2) plus grande à pH 5,5 qu'à pH 4,4 : en effet, à pH 5,5, moins favorable au développement de *B. cinerea* que pH 4,4, l'action antibiotique est fortement ressentie par la colonie du parasite à une distance du saprophyte beaucoup plus grande que celle notée à pH 4,4. Cela est particulièrement vrai pour la souche S_1 de *B. cinerea* qui présente une croissance équivalente à celle de S_2 et S_3 à pH 4,4, mais qui se développe particulièrement lentement à pH 5,5 (Fig. 4).

Recherche d'un effet de synergie (Tableau 11) : Les seuls résultats présentant quelque intérêt, ont été obtenus par application des couples d'antagonistes *Myrothecium* sp. (n° 2)-*A. dauci* (34 % d'inhibition contre 30 % à *Myrothecium* sp. (n° 2) et 28 % à *A. dauci* utilisés seuls) et *E. purpurascens*-*Myrothecium* sp. (n° 2) (43 % d'inhibition contre 39 % à *E. purpurascens* et 30 % à *Myrothecium* sp. (n° 2) utilisés seuls). Ces résultats sont à la limite de signification et m'incitent à la prudence. Aussi énoncerai-je qu'aucun effet synergique vraiment significatif n'a pu être mis en évidence par application des différents couples d'antagonistes actifs face au parasite (Tabl.10).

Au cours de cette recherche d'effet de synergie, j'ai noté en outre les deux faits suivants :

- *Trichoderma* sp. (a) inhibe non seulement le développement du parasite, mais aussi celui du saprophyte qui lui est adjoint grâce à sa croissance rapide et à sa nette action de contact ;

- *Myrothecium* sp. réduit notablement par son action à distance la croissance mycélienne de *T. viride*.

L'antagonisme entre saprophytes tel que je l'ai mis en évidence par ces deux faits, ne doit pas être négligé ou sous-estimé dans la mise au point d'une méthode de lutte biologique.

A la suite de cette première étude, quatre antagonistes [*Myrothecium* sp. (n° 1), *T. viride* et *Trichoderma* spp. (a) et (b)] ont été retenus pour la seconde phase d'investigations sur les trois souches de *B. cinerea*.

1.2.2.2. Evaluation du taux de l'Inhibition de croissance en surface (Is) de *B. cinerea* par quatre germes antagonistes efficients

Les principaux résultats de cette confrontation directe à 22° C sont rassemblés dans le Tableau 12 et la Fig. 8.

Par son action à distance, *Myrothecium* sp. (n° 1) se montre un antagoniste efficient en confrontation directe avec chacune des trois souches de *B. cinerea* ; à pH 4,5, son activité, sur les souches S_2 et S_3 est supérieure ou égale à celle des trois *Trichoderma* et, à pH 5,5, sur les 3 couches de *B. cinerea*, il domine *Trichoderma* sp (a) et *T. viride*.

A pH 4,5, les trois *Trichoderma* ont, par contact, une nette efficacité, quantitativement comparable en général, avec cependant un avantage net pour *Trichoderma* sp. (b) en confrontation avec S_1 ; à pH 5,5, le classement des *Trichoderma*, établi dans l'ordre d'efficacité décroissante sur les trois souches de *B. cinerea* est le suivant :

Trichoderma sp. (b) > *Trichoderma* sp. (a) > *T. viride*

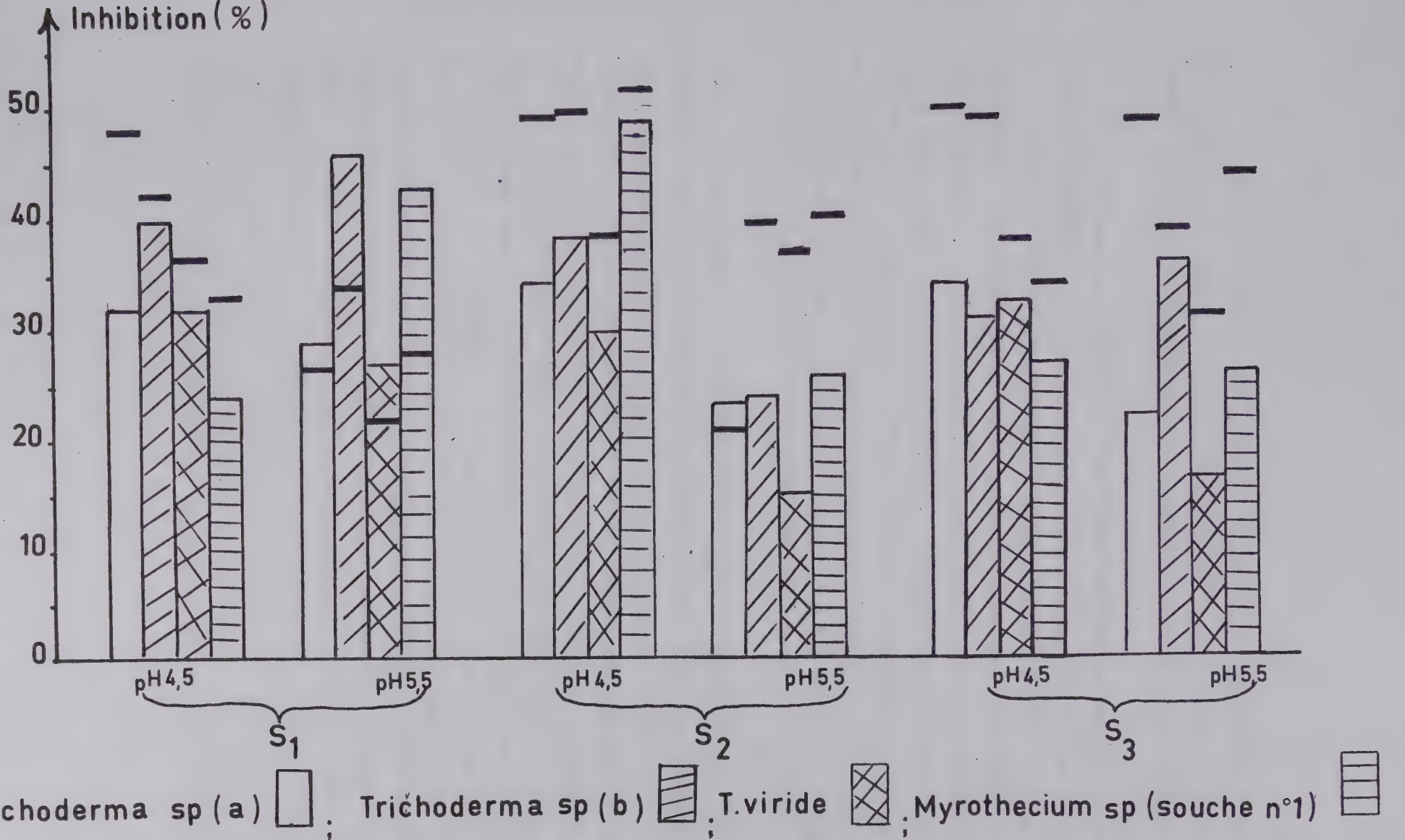
Je note comme précédemment (1.2.2.1. et Tableau 10) qu'à la différence de *Myrothecium* sp. (n° 1), *Trichoderma* sp. (a) et *T. viride* sont moins actifs à pH 5,5 qu'à pH 4,5.

Dans cette expérience, *Trichoderma* sp. (b), par la régularité de son haut niveau d'activité aux deux pH à l'encontre des trois souches, apparaît comme le meilleur des *Trichoderma* ; en outre, par son action principalement de contact, il se montre, au total, au moins aussi efficient que *Myrothecium* sp. (n° 1) agissant à distance : sur six cas expérimentaux, *Trichoderma* sp. (b) prend deux fois l'avantage sur *Myrothecium* sp. (n° 1) (S_1 à pH 4,5 et S_3 à pH 5,5), montre trois fois une activité équivalente à ce dernier (S_3 à pH 4,5 ; S_1 et S_2 à pH 5,5) et est dominé dans un cas par *Myrothecium* sp. (n°1) (S_2 à pH 4,5).

Souche de *B. cinerea*	Age des cultures (en jours)	Antagoniste impliqué	pH 4,5		pH 5,5	
			S_0 ou S_A (en cm^2)	I_s (%)	S_0 ou S_A (en cm^2)	I_s (%)
S_1	2 j	Témoin	11,13	-	4,06	-
		Trichoderma sp. (a)	7,96	28 (NS)	3,65	10 (NS)
		Trichoderma sp. (b)	8,86	20 (NS)	3,21	21 (S)
		T. viride	8,78	21 (NS)	4,00	1 (NS)
		Myrothecium sp. (n° 1)	9,46	15 (NS)	3,03	26 (S)
	3 j	Témoin	29,66	-	13,31	-
		Trichoderma sp. (a)	20,03	32 (S)	9,45	29 (NS)
		Trichoderma sp. (b)	17,65	40 (S)	7,49	47 (S)
		T. viride	20,87	30 (S)	9,63	28 (NS)
		Myrothecium sp. (n° 1)	22,55	24 (S)	7,50	44 (S)
S_2	2 j	Témoin	12,06	-	5,76	-
		Trichoderma sp. (a)	8,57	29 (NS)	5,21	10 (NS)
		Trichoderma sp. (b)	9,82	18 (NS)	5,19	10 (NS)
		T. viride	8,92	26 (NS)	5,22	9 (NS)
		Myrothecium sp. (n° 1)	6,69	44 (S)	4,95	14 (NS)
	3 j	Témoin	31,60	-	19,93	-
		Trichoderma sp. (a)	20,59	35 (S)	15,27	23 (S)
		Trichoderma sp. (b)	19,42	39 (S)	15,18	24 (S)
		T. viride	22,12	30 (S)	16,98	15 (S)
		Myrothecium sp. (n° 1)	16,18	49 (S)	14,73	26 (S)
S_3	2 j	Témoin	10,55	-	5,65	-
		Trichoderma sp. (a)	7,38	30 (S)	5,35	5 (NS)
		Trichoderma sp. (b)	7,82	26 (S)	5,06	10 (NS)
		T. viride	7,50	29 (S)	5,41	4 (NS)
		Myrothecium sp. (n° 1)	8,43	20 (NS)	5,13	9 (NS)
	3 j	Témoin	28,15	-	17,48	-
		Trichoderma sp. (a)	18,96	34 (S)	13,54	23 (S)
		Trichoderma sp. (b)	19,42	31 (S)	11,11	36 (S)
		T. viride	18,98	33 (S)	14,56	17 (S)
		Myrothecium sp. (n° 1)	20,62	27 (S)	12,92	26 (S)

Tableau 12 - Confrontation directe de *B. cinerea* (S_1,S_2,S_3) avec chacun des quatre antagonistes retenus. Deux pH (4,5 et 5,5) ont été expérimentés ; milieu PCA ; 22° C ; obscurité. S_A = surface moyenne (en cm^2) de 10 colonies de *B. cinerea* en présence d'un antagoniste ; S_0 = surface moyenne de 10 colonies de *B. cinerea* en absence d'antagoniste (Témoin).

Les inhibitions de croissance (I_s) sont exprimées en pour cent de la croissance des colonies témoins correspondantes ($I_s = \frac{S_0 - S_A}{S_0} \times 100$) ; le test U de MANN et WHITNEY a été appliqué aux différents échantillons à comparer. (S) : significatif ; (NS) : non significatif.



re 8 - Inhibition (%) de la croissance du mycélium de *B. cinerea* directement confronté pendant 3 jours avec chacun des antagonistes retenus, sur milieu solide PCA, à 22° C, à l'obscurité. Deux pH expérimentés : 4,5 et 5,5. Chaque inhibition de croissance en surface Is (en %) est représentée par un rectangle dont la longueur précise le niveau ; le petit trait gras horizontal couplé avec chacun des rectangles situe le niveau correspondant de l'inhibition lorsqu'elle est exprimée en pour cent de la croissance radiale (I). Le comportement de 3 souches de *B. cinerea* (S_1,S_2,S_3) a été étudié.

Dans la Fig. 8 , pour chaque échantillon expérimental impliquant S_1, S_2 ou S_3, le taux d'inhibition de croissance en surface I_s peut être comparé au taux correspondant d'inhibition de la croissance radiale I.

Lorsque les conditions favorisent le développement du parasite tout en permettant une bonne activité antagoniste, le parasite peut grâce à sa vitesse de croissance, échapper totalement ou partiellement au moins, à l'action de l'antagoniste dans ses zones de croissance latérales et distale alors que dans sa zone proximale, il en est plus ou moins rapidement empêché par l'action de contact ou à distance de l'antagoniste : dans ce cas, I_s est inférieur à I. C'est ce qui se produit lorsque, par exemple, S_1, S_2 ou S_3 est confronté à chacun des quatre antagonistes à pH 4,5 (Fig. 8) (cela n'est pas surprenant car les 3 souches de *B. cinerea* ainsi que les 4 antagonistes ont à pH 4,5 et à 22°-25° C une bonne croissance mycélienne (Fig. 4 et 7).

Mais quand les conditions provoquent un ralentissement de la progression mycélienne du parasite en affectant moins (ou en n'affectant pas) le développement de l'antagoniste associé, la colonie du parasite, à croissance lente, est plus aisément et plus rapidement entourée par un antagoniste à action de contact que la colonie d'un parasite à croissance rapide. Du fait de sa croissance lente, le parasite peut aussi moins aisément se libérer, même dans les parties latérale et distale du front de croissance de sa colonie, de l'influence des composés télétoxiques qui ont diffusé à partir d'un antagoniste agissant par émission antibiotique. Ainsi, que l'action soit de contact ou à distance, le développement de la colonie du parasite, affecté non seulement dans sa zone proximale mais aussi nettement influencé dans ses zones latéraleset distale, se caractérise alors par un I_s très fréquemment supérieur à I : c'est ce qui se produit, par exemple,lorsque S_1 est confronté à chacun des quatre antagonistes à pH 5,5, à 22° C (Fig. 8) (dans ces conditions, un ralentissement de croissance affecte les colonies témoins de S_1 ainsi que, à un moindre degré, celles des trois *Trichoderma*

capables d'agir principalement par contact : Tableau 9 ; quant à l'action télétoxique de *Myrothecium* sp. (n° 1), elle est, dans ces conditions, bientôt nettement ressentie dans les zones latérales et distale des colonies, à croissance lente, de S_1, entrainant dans ce cas-là aussi l'inégalité $I_s > I$ (Fig. 8).

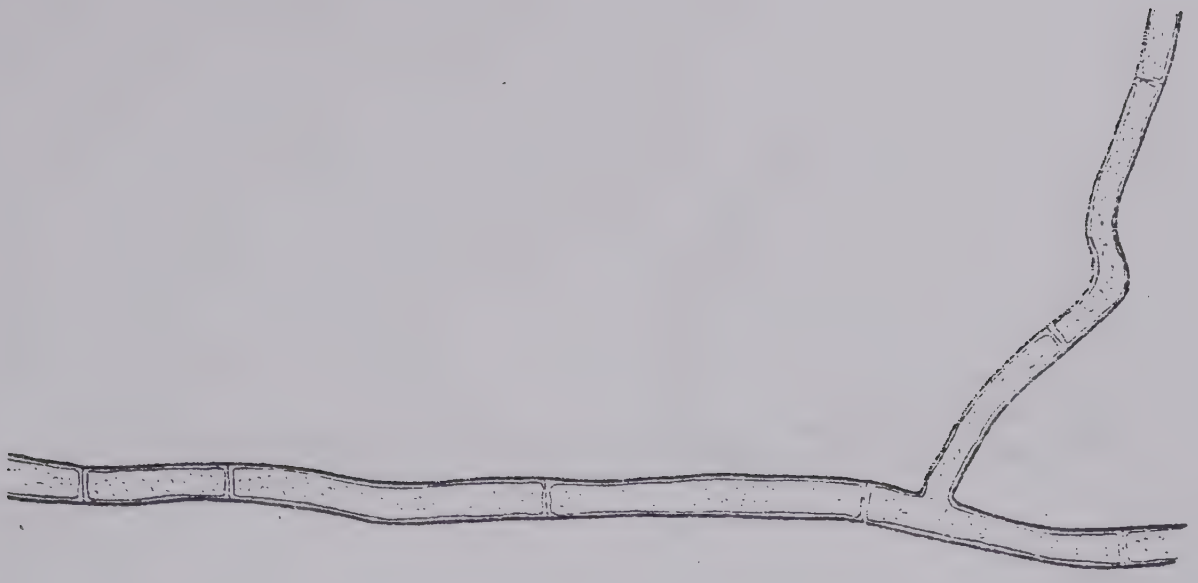
Comme j'ai déjà eu l'occasion de l'énoncer, I_s est plus représentatif de l'action antagoniste d'un saprophyte que I ; en effet, la valeur I_s rend compte de la globalité du phénomène d'antagonisme qui affecte la colonie du parasite en intégrant les effets produits par l'antagoniste sur les zones proximale, latérales et distale de la colonie du parasite.

Aspects morphologiques de la confrontation directe : observation d'anomalies

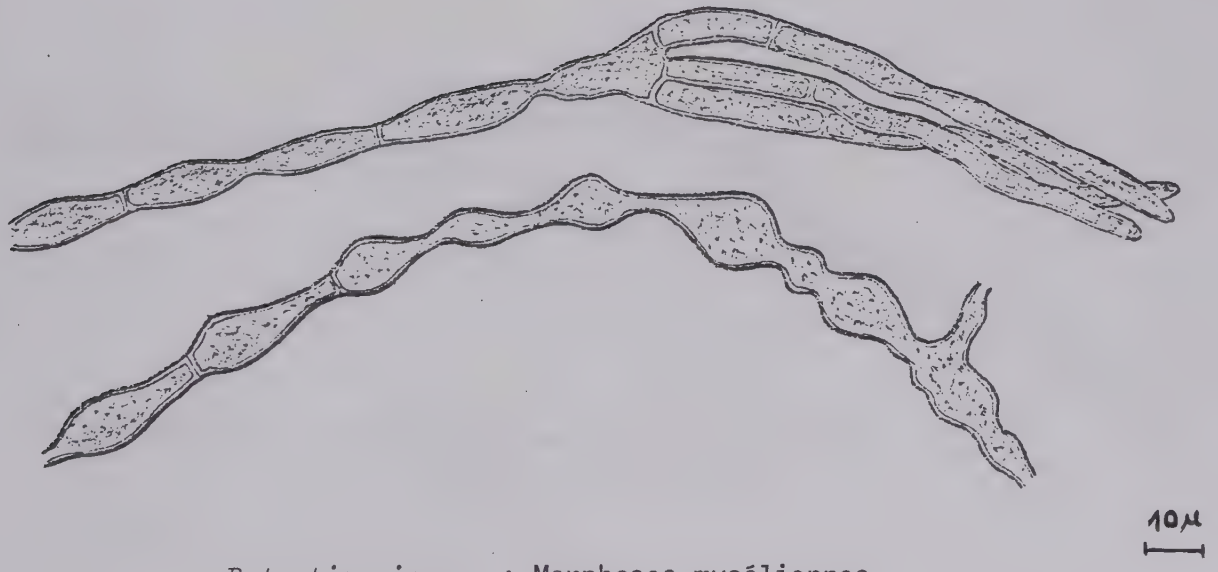
Des prélèvements de mycéliums ont été effectués à différents endroits de colonies âgées de 3 jours de *B. cinerea* directement confrontées aux antagonistes efficients sur milieu PCA à pH 4,5. Ces prélèvements colorés au bleu coton, montés au lactophénol et examinés en microscopie photonique, ont permis l'observation d'anomalies dans les jeunes hyphes mycéliennes de la zone proximale des colonies.

Par son action à distance, *Myrothecium* sp. (n° 1) induit chez l'hyphe jeune en croissance du parasite, l'anomalie la plus spectaculaire : il s'agit du renflement symétrique des articles mycéliens en formation ou néoformés, ceux-ci prenant une forme ellipsoïdale ou ovoïde (Fig. 9). Une telle anomalie peut s'expliquer soit par une augmentation de la pression de turgescence provoquant alors la déformation de la jeune paroi latérale de l'hyphe, soit par une déficience de la synthèse de chitine entrainant un défaut de rigidification de cette jeune paroi, soit encore par la conjugaison de ces deux phénomènes. A cette anomalie, s'en ajoutent deux autres concernant aussi ces hyphes renflées :

1) une hyperseptation irrégulière avec formation de quelques articles très courts incapables de se renfler ;
2) une réduction du taux de ramification par rapport à celui concernant l'hyphe témoin de *B. cinerea* (Fig. 9).

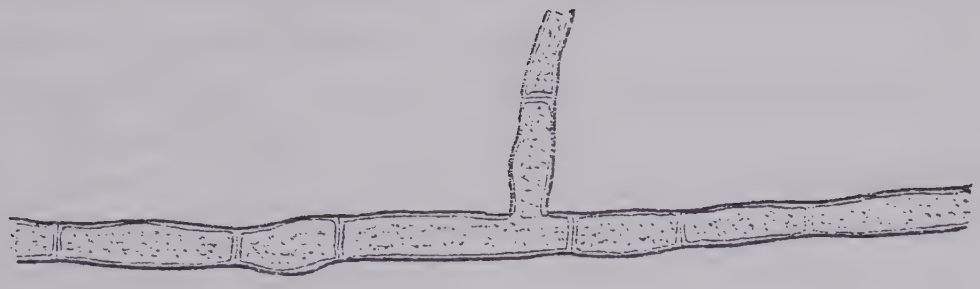


Botrytis cinerea : mycélium témoin

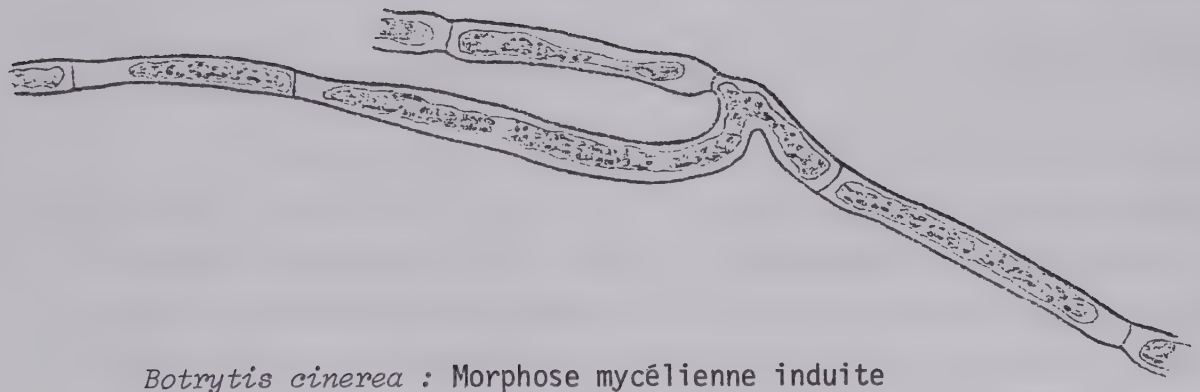


Botrytis cinerea : Morphoses mycéliennes
induites par *Myrothecium* sp. (n°1)

Figure 9



Botrytis cinerea : Morphose mycélienne induite par *Trichoderma viride*.



Botrytis cinerea : Morphose mycélienne induite par *Trichoderma* sp. (a).

Figure 10

Quant à *Trichoderma* sp. (a) et à *Trichoderma* sp. (b), ils provoquent l'un et l'autre, à distance, sur le mycélium en croissance de *B. cinerea*, les mêmes anomalies à savoir :

1) une hyporamification de jeunes hyphes qui par ailleurs présentent une forme et une fréquence de septation normales ;

2) une altération du contenu des cellules hyphales se traduisant par l'observation d'un protoplasme granuleux qui progressivement se rétracte et se fragmente en masses hypercolorables au bleu coton (Fig.10).

Dans leurs revues bibliographiques, HORSFALL (1956) et ALBERTINI et YOKA (1976) ont recensé les aberrations morphologiques, consécutives à l'action de fongicides ou d'antibiotiques, qui affectent les hyphes mycéliennes ou les tubes conidiens en croissance. Ces auteurs distinguent quatre formes essentielles d'anomalies :

1) hyphes ou tubes germinatifs renflés,

2) hyphes ou tubes germinatifs déformés, contournés et allant jusqu'à décrire une spirale,

3) hyphes ou tubes germinatifs précocément et plus intensément ramifiés,

4) formation d'anses d'anastomose au niveau de tubes germinatifs.

Le renflement des articles mycéliens de *B. cinerea* dû à l'action antibiotique de *Myrothecium* sp. (n° 1) est une aberration qui se rattache à la 1^{e} forme indiquée ci-dessus. Quant à l'hyporamification des hyphes de *B. cinerea*, hyporamification causée par l'action antibiotique de *Myrothecium* sp. (n° 1) et des *Trichoderma* spp. (a) et (b), elle constitue une forme d'aberration peu fréquente en regard des observations d'hyperramification (4^{e} forme) couramment effectuées (voir la revue de HORSFALL, 1956).

A titre d'exemple, citons les observations de BRIAN, CURTIS et HEMMING (1946) concernant l'action de la griséofulvine émise par un *Penicillium* ; ces auteurs ont notamment observé, sur les jeunes hyphes de *Botrytis allii*, d'une part, un gonflement des hyphes analogues à celui que j'ai constaté sur celles de *B. cinerea* en présence de *Myrothecium* sp. (n° 1), d'autre part, une hyperramification hyphale qui contraste avec l'hyporamification provoquée par trois des antagonistes /*Myrothecium* sp. (n° 1), *Trichoderma* spp. (a) et (b)/ que j'ai expérimentés. En m'en tenant à l'exemple de la griséofulvine, cet antibiotique a été rendu par EVANS (1968) responsable d'une inhibition de la biosynthèse de chitine qui expliquerait le gonflement des hyphes néoformées par défaut de rigidification de la paroi latérale. A cet égard, l'action antibiotique de *Myrothecium* sp. (n° 1) s'apparente à celle de la griséofulvine puisque, tout comme cette dernière, elle provoque le gonflement des articles hyphaux néoformés.

1.2.3. - Analyse des confrontations différées

1.2.3.1. Résultats obtenus par application de la méthode à la cellophane (Tabl. 13, 14 et 15) Planche I, Fig. 1 et 2

Je rappelle que l'utilisation d'une telle méthode permet de mettre en évidence et d'estimer le niveau d'efficacité de l'émission toxique ayant diffusé en 72 h à partir de l'inoculum antagoniste, à travers une membrane de cellophane dans la zone centrale de la boîte de Petri (voir 1.1.3.1.).

La considération des Tableaux 13 et 14 me permet d'énoncer que *Myrothecium* sp. (n° 1) est capable d'inhiber à 100 % la croissance mycélienne des trois souches expérimentées de *B. cinerea* sur PCA, l'inhibition totale de S_3 se produisant aussi bien à pH 5,5 qu'à pH 4,5. A ces deux pH, sur la souche S_3, *Trichoderma* sp. (b), tout comme *Myrothecium* sp. (n° 1) inhibe totalement le développement mycélien.

Quant à *Trichoderma* sp. (a) et à *T. viride*, ils inhibent aussi de façon très significative le développement des trois souches de *B. cinerea* (Tabl.13 et 14), mais cette inhibition qui n'est alors pas totale, tend à

Age (en jours) des cultures de *B. cinerea* (S_1, S_2)	*Myrothecium* sp. (n° 1)		*Trichoderma* sp. (a)		*T. viride*	
	I - S_1	I - S_2	I - S_1	I - S_2	I - S_1	I - S_2
3 j	100 % (S)	100 % (S)	56 % (S)	48 % (S)	36 % (S)	50 % (S)
4 j	100 % (S)	100 % (S)	/‾S_/	/‾S_/	/‾S_/	/‾S_/
5 j	100 % (S)	100 % (S)	/‾S_/	/‾S_/	/‾S_/	/‾S_/

Tableau 13 - *B. cinerea* (S_1, S_2) en confrontation différée de 72 h avec *Myrothecium* sp. (n° 1), *Trichoderma* sp. (a) et *T. viride* (Méthode à la cellophane). Etude, en fonction de la durée d'incubation, de la croissance mycélienne de *B. cinerea* sur milieu PCA (pH 4,5 ; 22° C ; obscurité). Les inhibitions de croissance I sont exprimées en pour cent de la croissance radiale de colonies témoins.

I - S_1 : inhibition de la croissance radiale de la souche S_1

I - S_2 : inhibition de la croissance radiale de la souche S_2

Application du test U de MANN et WHITNEY ; (S) : significatif - /‾S_/ : inhibition très significative mais non quantifiable car, dans les cultures témoins, *B. cinerea* a déjà colonisé toute la surface des boîtes de Petri de 100 mm de diamètre.

Age (en jours) des culture de *B. cinerea* (S_3)	*Myrothecium* sp. (n° 1)		*Trichoderma* sp. (b)		*Trichoderma* sp. (a)		*T. viride*	
	I à pH 4,5	I à pH 5,5	I à pH 4,5	I à pH 5,5	I à pH 4,5	I à pH 5,5	I à pH 4,5	I à pH 5,5
2 j	100 % (S)	100 % (S)	100 % (S)	100 % (S)	71 % (S)	68 % (S)	50 % (S)	45 % (S)
3 j	100 % (S)	100 % (S)	100 % (S)	100 % (S)	65 % (S)	63 % (S)	49 % (S)	39 % (S)
4 j	100 % (S)	100 % (S)	100 % (S)	100 % (S)	62 % (S)	56 % (S)	47 % (S)	34 % (S)
5 j	100 % (S)	100 % (S)	100 % (S)	100 % (S)	/‾S_/	50 % (S)	/‾S_/	29 % (S)

Tableau 14 - *B. cinerea* (S_3) en confrontation différée de 72 h avec *Myrothecium* sp. (n° 1), *Trichoderma* sp. (a) *Trichoderma* sp. (b) et *T. viride*. Etude, en fonction de la durée d'incubation, de la croissance mycélienne de *B. cinerea* pour deux valeurs de pH du milieu PCA (4,5 et 5,5 ; 22° C ; obscurité. Les inhibitions de croissance I sont exprimées en pour cent de la croissance radiale de colonies témoins. Application du test U de MANN et WHITNEY ; (S) : significatif. Signification de /‾S_/ : voir légende du Tableau 13.

Souches \ Age (en jours) cult. *B. cinerea*	M_1 d /Bc x $T_{(a)}$/ (1)			$T_{(b)}$ d /Bc x $T_{(a)}$/			$T_{(a)}$ d /Bc x T.v./			Tv d /B c x $T_{(a)}$/		
	3 j	4 j	5 j	3 j	4 j	5 j	3 j	4 j	5 j	3 j	4 j	5 j
S_1	100 % (S)	100 % (S)	100 % (S)	-	-	-	75 % (S) *(86)*	72 % (S) *(85)*	[S]	75 % (S) *(86)*	71 % (S) *(84)*	[S]
S_2	100 % (S)	100 % (S)	100 % (S)	-	-	-	75 % (S) *(86)*	73 % (S) *(85)*	[S]	73 % (S) *(85)*	70 % (S) *(84)*	[S]
S_3	100 % (S)	100 % (S)	100 % (S)	100 % (S)	100 % (S)	100 % (S)	82 % (S) *(90)*	77 % (S) *(88)*	[S]	64 % (S) *(80)*	54 % (S) *(74)*	[S]

Tableau 15 - Evolution du pourcentage d'inhibition de la croissance en surface (I_s) de *B. cinerea* (S_1,S_2,S_3) par les germes antagonistes au cours d'une expérience conjugant la confrontation différée (d) de 72 h avec *Myrothecium* sp. (n° 1) (= M_1), *Trichoderma* sp. (a) (= $T_{(a)}$), *Trichoderma* sp. (b) (= $T_{(b)}$) ou *T. viride* (= Tv) et la confrontation directe (X) avec $T_{(a)}$ ou Tv (méthode de confrontation différée à la cellophane). Cultures en milieu PCA ; pH 4,5 ; 22° C ; obscurité. Le test U de MANN et WHITNEY a été appliqué ; (S) = significatif. Signification de [S] : voir la légende du Tableau 13.

(1) : à titre d'exemple, M_1 d /Bc x $T_{(a)}$/ se lit : *B. cinerea* en confrontation différée (d) avec *Myrothecium* sp. (n° 1) et en confrontation directe (X) avec *Trichoderma* sp. (a).

Valeurs entre parenthèses et en italiques : inhibitions de la croissance radiale I (en %).

régresser avec le temps (Tabl. 14). Cette inhibition peut être accrue et mieux maintenue à son haut niveau initial si la confrontation différée avec l'un de ces deux antagonistes est associée à la confrontation directe avec l'autre antagoniste (comparer les valeurs de I du Tabl. 15 avec celles du Tabl. 14).

A l'issue de cette série de tests de confrontation différée (tests réalisés par application de la méthode à la cellophane), le classement des antagonistes rangés dans l'ordre d'efficacité décroissante est le suivant : *Myrothecium* sp. (n° 1) = *Trichoderma* sp. (b) > *Trichoderma* sp. (a) > *T. viride*.

1.2.3.2. Résultats obtenus par application de la méthode du milieu solide enrichi en filtrat de l'antagoniste (Tableau 16 et Fig. 11). Planche II (Fig. 3 et 4)

Je rappelle qu'une telle méthode a été appliquée dans le but de mieux connaître le niveau d'efficacité, de persistance et de stabilité à la chaleur du ou des composés toxiques émis par les germes antagonistes.

La considération des résultats du Tabl. 16 me conduit à énoncer que *Myrothecium* sp. (n° 1) produit un ou plusieurs composés toxiques qui présentent sur *B. cinerea* (S_3), une très haute activité à pH 4,5 puisque, à ce pH, le fitrat de culture de l'antagoniste dilué au demi inhibe totalement la croissance mycélienne du parasite. Il faut souligner que la toxicité de ce filtrat n'est pas affectée par le traitement à l'autoclave (104° C) pendant 30 mn. A pH plus élevé (5,6-6,4), le filtrat de *Myrothecium* est nettement moins efficient. Notons qu'aux deux pH, l'activité du filtrat baisse sensiblement avec le temps notamment aux faibles concentrations.

Dans ce type de confrontation, *Myrothecium* sp. (n° 1) se montre, à pH 4,5-5,1, nettement supérieur à *Trichoderma* sp. (a) (Fig. 11) ; ce dernier a cependant une activité toxique non négligeable puisque son filtrat dilué au demi réduit la croissance radiale de *B. cinerea* (S_3) de plus de 60 % (contre

Concentration en F.B. (en %)	50 %		50 % (autoclavé)	25 %		10 %	
Age (en jours) des cultures de *B. cinerea* (S_3)	I à pH 4,5	I à pH 6,4	I à pH 4,5	I à pH 4,5	I à pH 6,4	I à pH 4,5	I à pH 6,4
7 j	100 % (S)	43 % (S)	100 % (S)	69 % (S)	25 % (S)	28 % (S)	0,3 % (NS)
10 j	100 % (S)	37 % (S)	100 % (S)	43 % (S)	14 % (S)	14 % (S)	0,2 % (NS)

Tableau 16 - Inhibition de la croissance radiale I (%) de *B. cinerea* (S_3) à 22° C sur milieu solide RICHARDS-agar contenant 50 %, 25 % ou 10 % de filtrat brut (F.B.) de culture (âgée de 15 j) de *Myrothecium* sp. (n° 1) (culture de *Myrothecium* sp. effectuée à 25° C en milieu liquide de RICHARDS). 50 % (autoclavé) = Filtrat brut autoclavé à 104° C pendant 30 mn et dilué au demi.

Deux pH ont été expérimentés : le pH du filtrat brut de culture de *Myrothecium* sp. (6,1 à 5,6 selon la dilution) et pH 4,5 obtenu par addition de quelques gouttes d'acide citrique (0,1 M) au milieu RICHARDS-filtrat-agar en préparation (ce dernier pH convient mieux à la croissance mycélienne de *B. cinerea*).

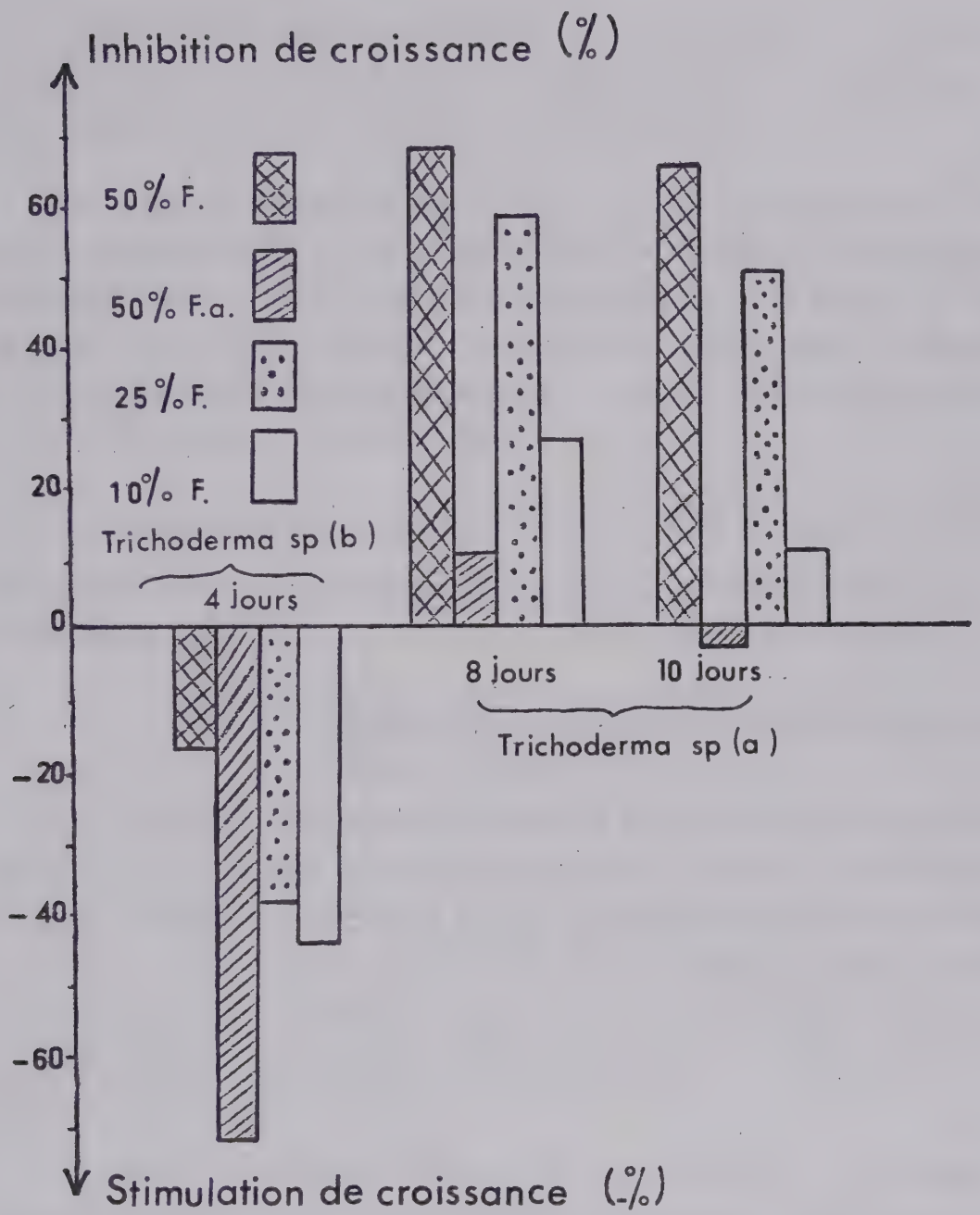


Figure 11 - Inhibition de la croissance radiale I (%) de *B. cinerea* (S_3) à 22° C sur milieu solide RICHARDS-agar contenant 50 % (= 50 % F),), 25 % (= 25 % F) ou 10 % (=10 %) de filtrat brut de culture (âgée de 8 jours) de *Trichoderma* sp. (a) (pH 5,1) ou de *Trichoderma* sp. (b) (pH 4,5) (cultures de *Trichoderma* spp. (a) et (b) effectuées à 25° C en milieu liquide de RICHARDS). 50 % F.a. = filtrat brut autoclavé à 104° C pendant 30 mn et dilué au demi.

100 %, rappelons-le, par *Myrothecium* sp. (n° 1). En outre, à la différence de ceux de *Myrothecium* sp. (n° 1), les composés actifs du filtrat de *Trichoderma* sp. (a) sont thermiquement très instables (Fig. 11).

Quant au filtrat de *Trichoderma* sp. (b), non seulement il n'inhibe pas la croissance de *B. cinerea*, mais encore il stimule le développement du pathogène (Fig. 11) et il le stimule d'autant plus qu'il a subi le traitement thermique : ce dernier traitement favorise vraisemblablement la dégradation et/ou la restructuration de composés du filtrat en métabolites bien utilisés par le pathogène pour sa croissance.

Classement des antagonistes à la suite de ce type de confrontation : *Myrothecium* sp. (n° 1) > *Trichoderma* sp. (a) >> *Trichoderma* sp. (b), ce dernier étant inactif.

1.2.3.3. Résultat de la confrontation différée en milieu liquide (Tableau 17)

Ce type de confrontation rappelle beaucoup, par son protocole (voir 1.1.3.2.), le type de confrontation dont je viens d'énoncer les résultats : la différence essentielle en est la nature physique du milieu qui ici est liquide, alors qu'elle était solide dans le type précédemment étudié. Aussi, les résultats concernant les antagonistes actifs /*Myrothecium* sp. (n° 1) et *Trichoderma* sp. (a)/ (Tableau 17) sont-ils assez concordants avec ceux du précédent test (Tableau 16 et Fig. 11).

Seule l'influence du filtrat de *Trichoderma* sp. (b) diffère ici assez nettement de celle notée dans le test précédent : en effet, dans la présente confrontation, le filtrat de champignon ralentit très légèrement le développement de *B. cinerea* (S_3) (inhibition de croissance pondérale I_p de 3 % à la concentration de 25 % : Tabl. 17) alors que dans le test analogue sur milieu solide (Fig. 11), il le stimule nettement (stimulation de croissance radiale de 39 %, à la même concentration de 25 %).

Concentration en filtrat brut (%) / Antagoniste et pH initial (pH_0) de culture de *B. cinerea* (S_3)	100	50	25	10
Myrothecium sp. (n° 1) (pH_0 5,6)	100 %	67 %	15 %	1 %
Trichoderma sp. (a) (pH_0 5,1)	64 %	22 %	9 %	6 %
Trichoderma sp. (b) (pH_0 4,4)	4 %	4 %	3 %	0 %

Tableau 17 - Pourcentages d'inhibition de la croissance pondérale (Ip) de *B. cinerea* (S_3) cultivé pendant 16 j à 22° C (obscurité) en milieu liquide de RICHARDS en présence de différentes concentrations de filtrat de culture de *Myrothecium* sp. (n° 1), de *Trichoderma* sp. (a) ou (b). Chaque filtrat provient d'une culture, âgée de 8 j, d'antagoniste incubé à 25° C, à l'obscurité, en milieu liquide de RICHARDS.

Le classement des antagonistes, établi lors du précédent test, n'est donc pas modifié :

Myrothecium sp. (n° 1) > *Trichoderma* sp. (a) >> *Trichoderma* sp. (b) quasiment inactif.

1.3. - CONCLUSION RELATIVE A L'ACTION DES GERMES ANTAGONISTES SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE DE *B. cinerea*

Le Tableau 18 rapporte le classement des antagonistes retenus au terme de l'application des différents tests.

Myrothecium sp. (n° 1) agissant par émission de toxines thermostables se classe en tête dans les différents tests.

Trichoderma sp. (b) agit à la fois par contact (action importante lui permettant d'être 1er au classement des tests de confrontation directe) et par émission antibiotique nette (1er au classement du test à la cellophane) mais ses composés toxiques sont thermiquement instables et très aisément dégradés lors des opérations de filtration et de préparation des milieux (tests des filtrats en milieu solide et en milieu liquide négatifs). Toujours est-il qu'en confrontation directe sur PCA, c'est l'action de contact de *Trichoderma* sp. (b) qui, du fait de la croissance rapide de cet antagoniste, est principalement perçue masquant en première analyse son action antibiotique pourtant réelle (puisque bien mise en évidence dans le test à la cellophane).

Supérieur à *T. viride*, *Trichoderma* sp. (a) agit principalement par contact, secondairement à distance grâce à une activité antibiotique non négligeable mais thermiquement instable.

Type de nfrontation	Classement des antagonistes dans l'ordre décroissant d'activité	Mode d'action
nfrontation directe	1e *Trichoderma* sp. (b)	action principalement de contact
	1e ex.aequo *Myrothecium* sp. (n° 1)	action exclusivement à distance
	3e *Trichoderma* sp. (a)	action principalement de contact
	4e *T. viride*	
nfrontation différée		
thode à la llophane	1e *Trichoderma* sp. (b)	très bonne activité antibiotique
	1e ex.aequo *Myrothecium* sp. (n° 1)	très bonne activité antibiotique
	3e *Trichoderma* sp. (a)	bonne activité antibiotique
	4e *T. viride*	assez bonne activité antibiotique
iltrat en lieu solide	1e *Myrothecium* sp. (n° 1)	très bonne activité antibiotique (thermostable)
	2e *Trichoderma* sp. (a)	assez bonne activité antibiotique (thermolabile)
	3e *Trichoderma* sp. (b)	nette stimulation, favorisée par traitement thermique, de la croissance du parasite
Filtrat en ieu liquide	1e *Myrothecium* sp. (n° 1)	très bonne activité antibiotique
	2e *Trichoderma* sp. (a)	assez bonne activité antibiotique
	3e *Trichoderma* sp. (b)	très faible activité antibiotique

Tableau 18 - Bilan de l'étude de l'action des antagonistes choisis sur la croissance mycélienne de *B. cinerea*.

Très actifs à l'encontre du développement mycélien de *B. cinerea*, *Myrothecium* sp. (n° 1), *Trichoderma* sp. (b) et *Trichoderma* sp. (a) ont été expérimentés en vue d'inhiber la germination conidienne de *B. cinerea* : c'est l'objet du chapitre 2.

CHAPITRE DEUXIEME

ACTION DES GERMES ANTAGONISTES SUR LA GERMINATION DES CONIDIES DE *Botrytis cinerea*

Le blocage du développement de *B. cinerea* peut découler d'une inhibition affectant soit l'émission et/ou la croissance du tube germinatif, soit ensuite la formation de l'appressorium, élément qui joue un rôle important dans le processus infectieux (CLARK et LORBEER, 1976).

Je me propose d'examiner l'action de germes antagonistes [*Myrothecium* sp. (n° 1), *Trichoderma* spp. (a) et (b)] sur la phase initiale du processus de contamination c'est-à-dire sur la germination conidienne [émission (= germination proprement dite) et élongation des tubes germinatifs] du pathogène.

Dans mon expérimentation, la suspension conidienne de *B. cinerea* a été soumise à l'influence de chacune des trois préparations suivantes d'antagoniste à savoir : le filtrat de culture, la suspension de mycélium, la suspension de conidies.

2.1. - METHODES DE CONFRONTATION

2.1.1. - Préparation des suspensions conidiennes de *B. cinerea*

Les conidies de *B. cinerea*, issues d'une culture incubée à 22° C, à l'obscurité, pendant 12 jours sur milieu PCA, ont été mises en suspension dans de l'eau distillée stérile ou dans une solution de glucose à 1 % car j'ai noté que le glucose (à 0,5 % - 1 %) favorise à la fois la germination proprement dite et l'élongation des tubes germinatifs des conidies du pathogène (observations personnelles). La concentration des suspensions obtenues a été ajustée à 2×10^5 spores/ml.

2.1.2. - Préparation et utilisation du filtrat de culture d'antagonistes

La technique mise en oeuvre pour l'obtention du filtrat d'une culture a été précédemment décrite (2e partie, 1.1.3.2.). Le filtrat recueilli a été expérimenté (après ajout d'un égal volume de suspension conidienne du parasite) aux différentes concentrations finales suivantes : 50 % (non autoclavé ou autoclavé à 104° C pendant 30 mn), 25 %, 10 %. pH de confrontation = 5,5 - 6,1 (voir indications complémentaires dans la légende du Tableau 19) (concentration finale de la suspension conidienne du parasite : 10^5 spores/ml).

2.1.3. - Préparation et utilisation de la suspension mycélienne de l'antagoniste

Des confettis de cellophane (de 5 mm de diam.) sont disposés en boîtes de Petri à la surface du milieu PCA ; chaque boîte est inoculée à différents endroits par l'antagoniste ce qui permet une colonisation rapide et régulière de tous les confettis. Ceux-ci sont prélevés au bout de 8 jours de culture : ils sont alors recouverts d'un mycélium en bonne végétation et relativement dense. Chaque cupule de lame à concavité reçoit alors un confetti dans 0,05 ml de tampon de MC ILVAINE dilué au 1/10 (gamme de pH étudiés : 3,0 ; 4,0 ; 5,0 ; 6,0 ; 7,0), le confetti étant agité avec soin pour améliorer la

dispersion du mycélium dans la cupule. 0,05 ml de la suspension sporale de *B. cinerea*, enrichie ou non en glucose (1 %), est soit immédiatement ajouté à la suspension mycélienne de l'antagoniste, soit ajouté après 20 h de préincubation du seul mycélium de l'antagoniste à 22° C (à l'obscurité), la préincubation ayant pour but de tenter d'enrichir, avant confrontation, le milieu en antibiotiques produits par le mycélium (concentration finale du tampon de MC ILVAINE : 1/20 ; concentration finale du glucose : 0,5 %).

2.1.4. - Préparation et utilisation de la suspension conidienne de l'antagoniste

Chaque suspension conidienne initiale d'antagoniste (10^6 spores/ml) a été réalisée à partir d'une culture de 12-15 jours en bonne végétation et fortement sporulante, dans une solution à 10 % de tampon de MC ILVAINE (zone de pH étudiée : de 3,0 à 7,0).

Dans une cupule de lame à concavité, après dépôt de 0,05 ml de suspension sporale d'antagoniste, 0,05 ml de la suspension sporale du parasite, enrichie ou non en glucose (1 %), est soit immédiatement ajouté, soit ajouté après 20 h de préincubation de la suspension sporale de l'antagoniste à 22° C (concentration finale de la suspension conidienne de l'antagoniste : 5×10^5 conidies/ml).

Dans ce type de confrontation, les concentrations conidiennes de l'antagoniste et du parasite sont donc respectivement de 5×10^5/ml et de 10^5/ml ; le rapport des concentrations expérimentées antagoniste/parasite est donc de 5/1 : il s'agit d'un rapport de faible valeur en regard de celles indiquées dans la bibliographie (voir la remarque 2.3.2.).

2.1.5. - Détermination des taux d'inhibition de germinations des conidies de *B. cinerea*

Les conidies de *B. cinerea* ont été incubées à 22° C, à l'obscurité, dans le milieu enrichi en antagoniste. Au bout de 20 h d'incubation, ont été déterminés :

1) le pourcentage d'inhibition I_G de la germination conidienne proprement dite :

$$I_G\ (\%) = \frac{G_T - G}{G_T} \times 100$$

G_T étant le % de conidies du témoin, émettant un tube germinatif ;
G le % de conidies qui, confrontées à l'antagoniste, émettent un tube germinatif ;
(I_G a été calculé à partir de lots traité et témoin de 300 conidies).

2) le pourcentage d'inhibition I_C de croissance des tubes germinatifs (TG) calculé à partir de 40 TG traités et de 40 TG témoins :

$$I_C\ (\%) = \frac{L_T - L}{L_T}$$

L_T = longueur moyenne des tubes germinatifs du témoin au bout de 20 h ;

L = longueur moyenne des tubes germinatifs des conidies confrontées avec l'antagoniste au bout de 20 h.

Il est bon d'indiquer que, dans chaque cas, les conidies témoins et les conidies confrontées ont été mises à germer dans des solutions de base similaires. Les milieux de référence sont donc les suivants :

1) le milieu de RICHARDS à dilution donnée qui sert de témoin pour le filtrat de culture à dilution correspondante ;

2) la solution de MC ILVAINE au 1/10, à pH donné, qui sert de témoin pour la suspension mycélienne ou conidienne de l'antagoniste au pH correspondant.

La suspension conidienne témoin est obtenue par mélange de 0,05 ml de milieu de référence ci-dessus défini et de 0,05 ml de la suspension conidienne du parasite (avec ou sans glucose) préparée selon les indications du paragraphe 2.1.1.

2.2. - RESULTATS DE L'ACTION DE GERMES ANTAGONISTES SUR LA GERMINATION CONIDIENNE DE *B. cinerea*

2.2.1. - Action de filtrats de culture sur la germination (Tabl. 19)

De l'observation du Tableau 19, ressortent les faits suivants :

1) le filtrat de *Myrothecium* sp. (n° 1) dilué au demi inhibe totalement la germination conidienne de *B. cinerea* alors que celui de *Trichoderma* sp. (a), à la même concentration, n'est pas efficient ;

2) la toxicité du filtrat de *Myrothecium* sp. (n° 1) est assez peu affectée par le traitement à l'autoclave (104° C) pendant 30 mn ;

3) le filtrat de culture de *Trichoderma* sp. (a) favorise la germination proprement dite des conidies de *B. cinerea*.

4) dans la mesure où le filtrat brut de culture de *Myrothecium* sp. (n° 1) ou de *Trichoderma* sp. (a) autorise la germination proprement dite, il favorise la croissance du tube germinatif TG, ce phénomène étant particulièrement net avec le filtrat de *Trichoderma* sp. (a) : en effet, en présence de ce filtrat (dilué au demi ou au quart, la vitesse de croissance du T.G devient le double de celle du témoin sans filtrat (Tableau 19).

2.2.2. - Action de la suspension mycélienne d'un antagoniste sur la germination

Les résultats de ce type de confrontation sont rassemblés dans les Tableaux 20 , 21 et 22. La considération de ces Tableaux me permet d'indiquer les faits suivants :

1) le mycélium de *Myrothecium* sp. (n° 1) est particulièrement actif à l'encontre de la germination conidienne des trois souches expérimentées de *B. cinerea* (Tableau 20). Quel que soit le pH d'incubation (entre 3,0 et 7,0),

Antagoniste impliqué	Concentration en filtrat brut (%) / Evaluations	50 %	50 % (autoclavé à 104° C, 30 mn)	25 %	10 %
Myrothecium sp. (n° 1)	% inhibition I_G de germination conidienne proprement dite	100 %	96 %	69 %	0 %
	% inhibition I_C de croissance des tubes germinatifs (TG)	100 %	- 3 %	- 5 %	- 24 %
Trichoderma sp. (a)	% inhibition I_G de germination conidienne proprement dite	- 4 %	- 13 %	- 7 %	- 10 %
	% inhibition I_C de croissance des TG	- 88 %	- 99 %	- 96 %	- 99 %

Tableau 19 - Inhibition (%) de germination des conidies de *B. cinerea* (S_3) soumises à l'influence de différentes concentrations de filtrat de culture de *Myrothecium* sp. (n° 1) ou de *Trichoderma* sp. (a). Au bout de 20 h d'incubation à 22° C, à l'obscurité, ont été déterminés :
1) le pourcentage d'inhibition I_G de la germination conidienne proprement dite par rapport au témoin : $I_G = \frac{G_T - G}{G_T} \times 100$
(G_T étant le % de conidies du témoin émettant un tube germinatif, G le % de conidies traitées (ici, confrontées au filtrat) émettant un tube germinatif). I_G a été calculé à partir de lots traité et témoin de 300 conidies.
2) le pourcentage d'inhibition I_C de croissance de tubes germinatifs (T_G) déterminé à partir de 40 T_G traités et de 40 T_G témoins.

Concentration de la suspension conidienne de *B. cinerea* : 10^5 conidies/ml.

N.B. : * chaque filtrat provient d'une culture, âgée de 8 jours, effectuée en milieu de RICHARDS, à 25° C, à l'obscurité.
* les pourcentages précédés du signe - indiquent une stimulation %.

Souche de *B. cinerea*	% inhibition I_G de la germination conidienne proprement dite				
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
S_1	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
S_2	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
S_3	87 %	87 %	100 %	100 %	100 %

Tableau 20 - Inhibition (%) de la germination proprement dite I_G des conidies de *B. cinerea* (S_1, S_2, S_3) au cours d'une confrontation directe avec une suspension mycélienne de *Myrothecium* sp. (n° 1) et pour différents pH. Détermination de I_G au bout de 20 h, à 22° C, à l'obscurité (voir renseignements concernant I_G dans la légende du Tableau 19).

Concentration de la suspension conidienne de *B. cinerea* : 10^5 conidies/ml.

N.B. - 1) la suspension mycélienne contenue dans 0,1 ml du mélange de confrontation placé dans une concavité provient d'un confetti de cellophane (de 5 mm de diam.) recouvert de mycélium.

2) les différents pH ont été obtenus au moyen de tampon de MC ILVAINE (dilué au 1/20 dans le mélange final de confrontation).

Antagoniste impliqué	Evaluations	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
Myrothecium sp. (n° 1)	I_G (%)	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	I_C (%)	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Trichoderma sp. (a)	I_G (%	10 %	0 %	0 %	0 %	0 %
	I_C (%)	59 %	62 %	50 %	44 %	39 %
Trichoderma sp. (b)	I_G (%)	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
	I_C (%)	10 %	12 %	5 %	3 %	0 %

Tableau 21 - Inhibitions (I_G et I_C) de la germination conidienne de *B. cinerea* (S_3) au cours d'une confrontation directe avec une suspension mycélienne de *Myrothecium* sp. (n° 1), de *Trichoderma* sp. (a) ou de *Trichoderma* sp. (b), en présence de glucose à 0,5 % et à différents pH. Les déterminations ont été effectuées au bout de 20 h d'incubation à 22° C, à l'obscurité.

La signification précise et le mode de détermination de I_G et de I_C sont indiqués dans la légende du Tableau 19 .

Concentration de la suspension conidienne de *B. cinerea* : 10^5 conidies/ml.

La préparation de la suspension mycélienne et le mode d'obtention des différents pH sont ceux indiqués dans la légende du Tableau 20.

Antagoniste impliqué	Evaluations	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
Trichoderma sp. (a)	I_G (%)	100 %	100 %	100 %	85 %	39 %
	I_C (%)	100 %	100 %	100 %	92 %	80 %
Trichoderma sp. (b)	I_G (%)	19 %	27 %	26 %	20 %	3 %
	I_C (%)	37 %	52 %	46 %	40 %	34 %

Tableau 22 - Inhibitions (I_G et I_C) de la germination conidienne de *B. cinerea* (S_3) au cours d'une confrontation directe avec une suspension mycélienne de *Trichoderma* sp. (a) ou (b) préincubé pendant 20 h à 22° C, en l'absence de *B. cinerea*, dans le milieu liquide de confrontation. (Confrontation directe en présence de glucose (0,5 %) et à différents pH).

Les déterminations ont été effectuées au bout de 20 h d'incubation à 22° C, à l'obscurité.

Voir autres indications dans la légende du Tableau 21.

N.B. - Les définitions de I_G et de I_C sont énoncées dans la légende du Tableau 19 .

cette efficience est patente, que le mélange d'incubation soit ou non enrichi en glucose (Tabl. 20 et 21).

2) sans préincubation, le mycélium de *Trichoderma* sp. (a) est très peu actif, celui de *Trichoderma* sp. (b) quasiment inactif (Tabl. 21). La préincubation du mycélium de l'un ou l'autre de ces antagonistes qui permet l'émission d'une quantité non négligeable d'antibiotiques avant confrontation avec les conidies de *B. cinerea*, est à l'origine d'un accroissement significatif du niveau d'activité, cet accroissement étant modéré chez *Trichoderma* sp. (b), particulièrement net chez *Trichoderma* sp. (a) (Tabl. 21 et 22) ; ainsi, en présence de *Trichoderma* sp. (a), à pH 4,0 (pH très favorable à la germination des conidies de *B. cinerea*), l'inhibition de germination proprement dite I_G (% inhibition de tubes émis) est nulle sans préincubation alors qu'après une préincubation de 20 h elle est de 100 % (Tabl. 21 et 22). Il faut remarquer que la préincubation améliore non seulement I_G mais aussi l'inhibition de croissance des tubes germinatifs I_C induite par les deux *Trichoderma* (comparer les Tableaux 21 et 22).

2.2.3. - Action de la suspension conidienne d'un antagoniste sur la germination des conidies de *B. cinerea* (Tabl. 23 et 24)

Le Tableau 23 rassemble les résultats concernant l'action de la suspension conidienne de *Myrothecium* sp. (n° 1) en fonction de différents facteurs /pH variant de 3,0 à 7,0, absence ou présence de glucose (0,5 %), non-préincubation ou préincubation (20 h) de la suspension de l'antagoniste/. La considération de ce tableau me permet d'énoncer les faits suivants :

1) non préincubée, la suspension conidienne de *Myrothecium* sp. (n° 1) qui n'inhibe que peu ou pas, entre pH 3,0 et pH 7,0, la germination proprement dite G des conidies des souches S_1 et S_3 de *B. cinerea*, présente, en l'absence de glucose (0,5 %), une nette activité à l'encontre de G et de l'élongation des tubes germinatifs des conidies de S_2 notamment à pH égal ou supérieur à 4,0 (lorsque le pH est $\geqslant$ à 4,0, I_G de S_2 varie entre 48 % et 67 %, I_C entre 68 % et 82 %).

Souche de *B. cinerea*	Evaluations	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
S_1	I_G(%) 0 gl[1]	0 %	1 %	2 %	5 %	5 %
	I_G(%) gl[2]	0 %	0 %	2 %	2 %	1 %
	I_G(%) pr[3]	69 %	87 %	100 %	100 %	100 %
	I_G(%) prgl[4]	0 %	5 %	7 %	7 %	64 %
	I_C(%) 0 gl	4 %	10 %	46 %	10 %	10 %
	I_C(%) gl	24 %	38 %	68 %	79 %	52 %
	I_C(%) pr	73 %	83 %	100 %	100 %	100 %
	I_C(%) prgl	70 %	71 %	74 %	68 %	66 %
S_2	I_G(%) 0 gl	3 %	55 %	61 %	67 %	48 %
	I_G(%) gl	0 %	3 %	14 %	21 %	32 %
	I_G(%) pr	22 %	47 %	100 %	100 %	100 %
	I_G(%) prgl	29 %	29 %	31 %	91 %	92 %
	I_C(%) 0 gl	36 %	68 %	82 %	78 %	71 %
	I_C(%) gl	59 %	73 %	85 %	88 %	85 %
	I_C(%) pr	36 %	73 %	100 %	100 %	100 %
	I_C(%) prgl	69 %	70 %	73 %	61 %	41 %
S_3	I_G(%) 0 gl	0 %	0 %	0 %	1 %	3 %
	I_G(%) gl	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
	I_G(%) pr	56 %	87 %	100 %	100 %	100 %
	I_G(%) prgl	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
	I_C(%) 0 gl	7 %	13 %	59 %	56 %	11 %
	I_C(%) gl	11 %	38 %	44 %	31 %	28 %
	I_C(%) pr	47 %	67 %	100 %	100 %	100 %
	I_C(%) prgl	49 %	59 %	67 %	62 %	60 %

Tableau 23 - Inhibitions (I_G et I_C) de la germination des conidies de *B. cinerea* (S_1,S_2,S_3) (10^5 conidies/ml) confrontées aux conidies de *Myrothecium* sp. (n° 1) (5×10^5 conidies/ml) en fonction de différents facteurs (présence ou absence de glucose, préincubation ou non préincubation des spores de l'antagoniste, différents pH). Les déterminations ont été effectuées au bout de 20 h d'incubation à 22° C, à l'obscurité.

(1) : 0 gl. = confrontation directe en l'absence de glucose
(2) : gl. = confrontation directe en présence de glucose (0,5 %)
(3) : pr. = confrontation directe avec une suspension sporale de *Myrothecium* sp. (n° 1) préincubée pendant 20 h à 22° C, en l'absence de *B. cinerea*, dans le milieu de confrontation (sans glucose).
(4) : prgl. = préincubation de *Myrothecium* sp. (n° 1) pendant 20 h à 22° C ; présence de glucose à 0,5 % dans le milieu de confrontation.

Les différents pH ont été obtenus au moyen du tampon de MC ILVAINE (dilué au 1/20 dans le mélange final de confrontation).

N.B. - Les definitions de I_G et de I_C sont énoncées dans la légende du Tableau 19 . Chaque I_G a été calculé à partir de lots traité et témoin de 300 conidies ; chaque I_C a été calculé à partir de 40 tubes germinatifs (TG) traites et de 40 TG temoins.

Souche de *B. cinerea*	Evaluations	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
S_1	I_G (%)	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
	I_C (%)	- 2 %	- 10 %	- 23 %	- 15 %	- 8 %
S_2	I_G (%)	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
	I_C (%)	- 5 %	- 13 %	- 20 %	- 10 %	- 5 %
S_3	I_G (%)	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
	I_C (%)	- 12 %	- 20 %	- 36 %	- 15 %	- 11 %

Tableau 24 - Inhibitions (I_G et I_C) de la germination des conidies de *B. cinerea* (S_1,S_2,S_3) (10^5 conidies/ml) confrontées aux conidies de *Trichoderma* sp. (b)*(5×10^5 conidies/ml) en présence de glucose (0,5 %) et à différents pH. Les déterminations ont été effectuées au bout de 20 h d'incubation à 22° C, à l'obscurité.

Signification de I_G et I_C : voir Tableau 19. Les différents pH ont été obtenus au moyen de tampon de MC ILVAINE (dilué au 1/20 dans le mélange final de confrontation).

(*) conidies de *Trichoderma* sp. (b) préincubées pendant 20 h à 22° C.

2) la suspension conidienne de *Myrothecium* sp. (n° 1) qui a été préincubée pendant 20 h, en l'absence de *B. cinerea*, est beaucoup plus active que la suspension conidienne de l'antagoniste non préincubée tant à l'encontre de la germination conidienne proprement dite G (après préincubation les valeurs de I_G et de I_C varient, selon la souche de *B. cinerea*, respectivement de 47 % à 87 % et de 67 % à 83 % à pH 4,0 ; elles atteignent l'une et l'autre 100 % à pH compris entre 5,0 et 7,0) (Tabl. 23 et Fig. 12). Ce net accroissement de l'action antagoniste de la suspension conidienne de *Myrothecium* sp. (n° 1) s'explique par le fait, que durant la préincubation de 20 h, les condies de l'antagoniste germent et différencient des hyphes qui enrichissent le milieu en antibiotiques avant confrontation.

3) d'une manière générale, la présence de glucose (0,5 %) dans le milieu contrarie l'action inhibitrice de la suspension conidienne de *Myrothecium* sp. (n° 1) surtout si cette suspension a été préincubée : les valeurs de I_C et surtout de I_G sont alors le plus souvent significativement plus basses (à titre d'exemple représentatif concernant S_1, après préincubation, à pH 4,0 alors que les valeurs de I_G et I_C sont respectivement de 87 % et 83 % en l'absence de glucose, elles sont de 5 % et 71 % en présence de glucose).

4) utilisée à la même concentration sporale que celle de *Myrothecium* sp. (n° 1) (5×10^5 spores/ml), la suspension sporale préincubée de *Trichoderma* sp. (b) se montre incapable d'inhiber, en présence de glucose (0,5 %), la germination proprement dite G des conidies de *B. cinerea* expérimentées à la concentration de 10^5 spores/ml. Bien plus, la suspension sporale de *Trichoderma* sp. (b) tend à favoriser l'élongation des tubes germinatifs des conidies du pathogène notamment entre pH 4,0 et pH 6,0 (Tabl. 24).

Quant à *Trichoderma* sp. (a), il sporule extrêmement peu ; de ce fait, le comportement de ses conidies n'a pu être étudié.

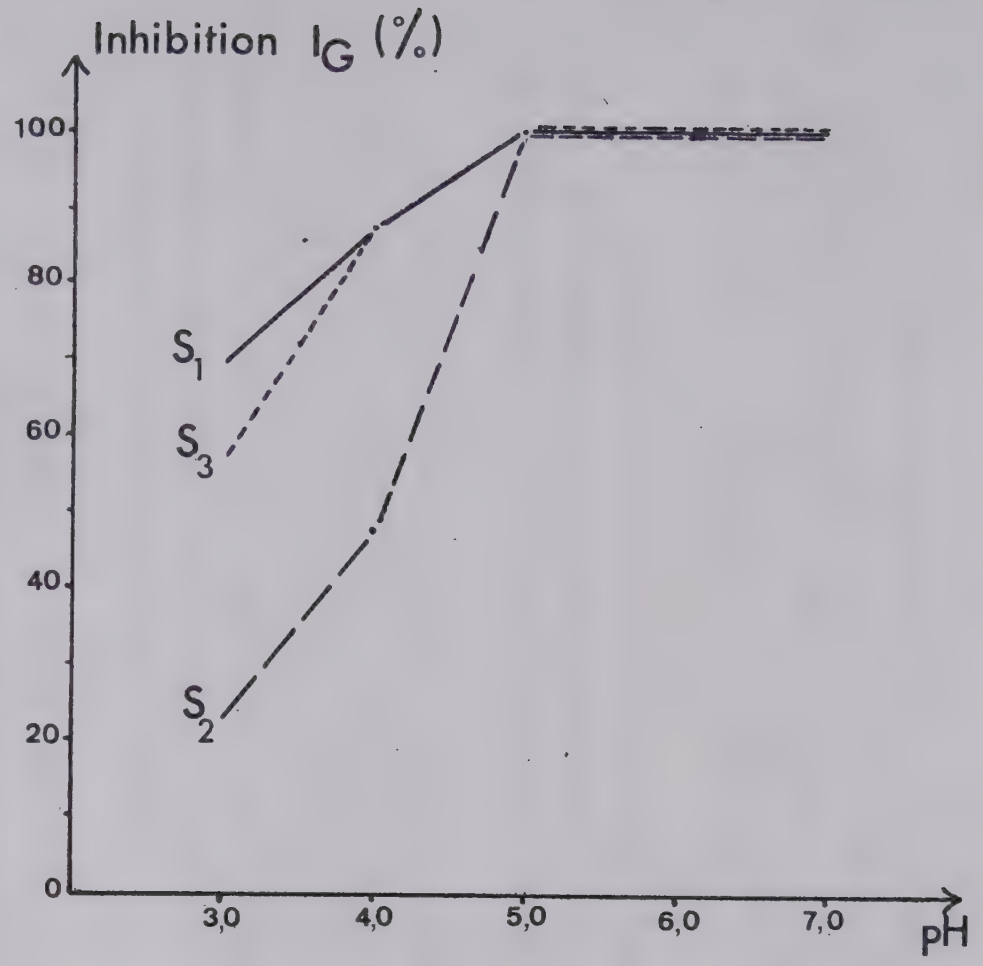


Figure 12 - Inhibition (%) de la germination conidienne proprement dite I_G (= inhibition d'émission des tubes germinatifs) de *B. cinerea* (souches S_1,S_2,S_3) (2×10^5 conidies/ml) au cours d'une confrontation directe, à différents pH, avec une suspension conidienne de *Myrothecium* sp. (n° 1) préincubée pendant 20 h à 22° C, en l'absence de *B. cinerea*, dans un milieu liquide de confrontation (en l'absence de glucose).
Les déterminations ont été effectuées au bout de 20 h d'incubation à 22° C, à l'obscurité.

2.3. - CONCLUSION ET REMARQUES

2.3.1. - Conclusion relative aux différentes confrontations antagoniste-conidies de *B. cinerea*

Les résultats positifs les plus marquants de la série de tests concernant la confrontation antagoniste-conidies de *B. cinerea* sont consignés dans le Tableau 25 récapitulatif.

A l'évidence, *Myrothecium* sp. (n° 1) se montre l'antagoniste le plus efficient grâce à sa forte activité antibiotique (par production d'antibiotiques thermostables) comme en témoignent les tests utilisant le filtrat de culture, le mycélium non préincubé, les conidies préincubées et même les conidies non préincubées de l'antagoniste.

L'activité antibiotique plus modérée (par antibiotiques thermolabiles) de *Trichoderma* sp. (a) n'est vraiment bien perçue que lorsque l'antagoniste est appliqué sous la forme de mycélium préincubé (Tabl. 25).

Quant à *Trichoderma* sp. (b), il n'inhibe modérément la germination des conidies de *B. cinerea* que sous la forme de mycélium préincubé, son action antibiotique s'exerçant alors plus sur l'élongation des tubes germinatifs que sur la germination conidienne proprement dite (Tableau 22). Sous la forme de conidies non préincubées, cet antagoniste se montre incapable d'inhiber la germination proprement dite des conidies ; bien plus, il tend alors à favoriser la croissance des tubes germinatifs émis (Tableau 24).

2.3.2. - Remarque relative au rapport entre la concentration conidienne de l'antagoniste et celle du parasite

La concentration sporale du germe antagoniste ainsi que le rapport entre cette concentration et celle du parasite sont des données dont l'importance n'a pas échappé à différents expérimentateurs : ainsi, l'action antagoniste la plus efficiente est généralement obtenue pour les concentrations les plus élevées en spores antagonistes (ex. : *Aureobasidium pullulans* antagoniste

Mode de confrontation	Antagonistes efficients et mode d'action	Niveau d'efficacité et remarques
Confrontation différée		
Filtrat de culture de 3 j. de l'antagoniste	*Myrothecium* sp. (n° 1) (action antibiotique)	I_G = 100 % lorsque le filtrat est dilué au 1/2. (action d'antibiotiques thermostables).
Confrontation directe		
Mycélium de l'antagoniste en suspension	*Myrothecium* sp. (n° 1) (action antibiotique)	I_G = 100 % (ou presque) entre pH 3,0 et pH 7,0 (avec ou sans glucose).
Conidies de l'antagoniste en suspension	*Myrothecium* sp. (n° 1) (action antibiotique)	Sur la souche S_2 entre pH 4,0 et pH 7,0 48 % < I_G < 67 % 68 % < I_C < 82 %
Confrontation différée et directe		
Mycélium préincubé de l'antagoniste	*Trichoderma* sp. (a) (action antibiotique)	I_G = 100 % de pH 3,0 à pH 5,0.
Conidies préincubées de l'antagoniste	*Myrothecium* sp. (n° 1) (action antibiotique)	I_G = 100 % de pH 5,0 à pH 7,0 47 % < I_G < 87 % } à pH 4,0 selon la 67 % < I_C < 83 % } souche de *B. cinerea*

Tableau 25 - Récapitulation des résultats positifs obtenus par la mise en oeuvre de différents modes de confrontation antagoniste-conidies de *B. cinerea*.

d'*Alternaria zinniae*, VAN DEN HEUVEL, 1969 ; *Penicillium notatum*, *Myrothecium roridum* et *Cladosporium herbarum* antagonistes de *Puccinia graminis tritici*, MISHRA et TEWARI, 1976) ; parfois cependant, l'inhibition maximale du parasite est obtenue pour une concentration sporale intermédiaire de l'antagoniste (concentration optimale) : ainsi, selon VAN DEN HEUVEL (1971), contre *Alternaria zinniae* ($6,25 \times 10^4$ spores/ml), l'antagoniste *Alternaria tenuissima* montre sa meilleure activité à la concentration sporale de $7,5 \times 10^6$/ml [rapport r optimal de la concentration sporale de l'antagoniste sur la concentration sporale du parasite = 120 ; un tel rapport est nettement inférieur à ceux déterminés à partir du niveau maximal (expérimenté) des antagonismes croissant en fonction de la concentration sporale saprophytique : r = 1000 pour *Myrothecium roridum/ P.graminis tritici* (MISHRA et TEWARI, 1976), r = 40.000 pour *Aureobasidium pullulans/Alternaria zinniae* (VAN DEN HEUVEL, 1969)_7.

Dans mon étude, le rapport de concentrations expérimenté antagoniste/parasite est r = 5 ; il s'agit d'un rapport dont la faible valeur en regard de celles de la bibliographie, n'en permet pas moins aux conidies préincubées de *Myrothecium* sp. (n° 1) d'inhiber complètement la germination des conidies de *B. cinerea* dans l'intervalle de pH 5,0-7,0 (Tabl. 23 et 25). Je pense que l'étude de la confrontation conidies de l'antagoniste-conidies de *B. cinerea* doit être reprise en augmentant considérablement r (r = 20, 100 ou 1000...) de manière à accroître notablement l'influence de germes tels que *Myrothecium* sp. (n° 1) et *Trichoderma* sp. (b) capables d'agir l'un et l'autre par émission antibiotique.

2.3.3. - Remarque relative au pH du milieu

Le pH influe, d'une part, sur la croissance mycélienne et sur la germination des conidies du parasite, d'autre part, sur l'activité notamment antibiotique des antagonistes. La considération des résultats obtenus à pH 4-5 me permet d'énoncer que chacun des trois antagonistes efficients montre, à pH 4-5, une action optimale ou peu déprimée par rapport à son optimum d'activité,

tant sur la croissance mycélienne que sur la germination conidienne du parasite (cf. Fig. 8, Tabl. 14 et 16 relatifs à la croissance mycélienne du parasite, Tabl. 20, 21 , 22 et 23 relatifs à sa germination conidienne) : or, à pH 4-5, croissance mycélienne et germination conidienne du parasite sont optimales (cf. 1^{e} partie, 1.3.2. et 2.3.4.3.). Une conclusion importante s'impose donc : les antagonistes actifs dominent donc aisément le pathogène au pH (4-5) le plus favorable tant à la croissance mycélienne qu'à la germination des conidies de celui-ci.

BILAN DES ACTIVITES ANTAGONISTES SUR LE MYCELIUM ET SUR LES CONIDIES DE *B. cinerea*

Je note que l'activité antibiotique (action à distance) induite par chacun des antagonistes expérimentés s'exprime de façon assez similaire sur les conidies et sur le mycélium du parasite. Les caractères de cette activité sont les suivants :

- chez *Myrothecium* sp. (n° 1) : forte activité, immédiatement perçue, par production d'antibiotiques thermostables.

- chez *Trichoderma* sp. (a) : activité moins soutenue, favorisée par la préincubation de l'antagoniste (celui-ci produit des antibiotiques thermolabiles).

- chez *Trichoderma* sp. (b) : activité antibiotique généralement assez peu ressentie par le pathogène (sauf dans le test à la cellophane sur mycélium), favorisée par la préincubation de l'antagoniste (celui-ci produit des antibiotiques thermolabiles).

Il faut, en outre, se rappeler que *Trichoderma* spp. (a) et (b) s'expriment non seulement par leur action antibiotique assez modérée, mais aussi par leur importante action de contact, cette dernière s'exerçant sur le mycélium en croissance et notamment sur les jeunes hyphes émises par les conidies du parasite.

CHAPITRE TROISIEME

ACTION DES GERMES ANTAGONISTES SUR LA FORMATION ET SUR LA GERMINATION DES SCLEROTES DE *Botrytis cinerea*

Au cours du développement du sclérote de *B. cinerea*, trois stades peuvent être distingués selon WILLETTS (1978) :

- l'initiation, c'est-à-dire l'agrégation d'hyphes pour former un petit primordium sclérotique ;

- la croissance en taille qui résulte de la ramification, de la croissance et de la densification des hyphes ; à la fin de ce stade, le sclérote a acquis sa taille maximale ;

- la maturation ou différenciation finale du sclérote se traduisant par la formation d'une enveloppe et par des modifications chimiques et de distribution touchant différents composés à l'intérieur des hyphes sclérotiques ; durant cette phase, le sclérote s'isole de sa colonie mère.

En culture *in vitro* sur PCA (à l'obscurité), les primordia des sclérotes (1^e stade de développement) apparaissent vers le 6^e-7^e jour à 22° C, le 12^e jour à 15° C, le 16^e jour à 10° C. D'abord blancs (1^e ou 2^e stade de développement), puis jaunâtres (fin du 2^e stade ou début du 3^e stade de développement), les sclérotes brunissent (3^e stade) pour finalement devenir noirs.

De taille et de forme variables, les sclérotes morphologiquement mûrs de *B. cinerea* peuvent germer de trois façons :

1) immédiatement (sans dormance) à 10° C ou à 22° C par production d'hyphes mycéliennes : c'est la germination mycéliogène qui se produit, entre autres, en boîte de Petri sur PCA à l'humidité relative de 100 % après humectation des sclérotes.

2) immédiatement (donc encore sans dormance), à 10° C ou à 22° C, par production de bouquets de conidiophores gris : c'est la germination conidiogène qui se produit, entre autres, quand les sclérotes sont disposés sur papier filtre imbibé d'eau distillée stérile, à l'humidité relative de 100 %. A l'obscurité, les conidiophores très nombreux, sont dirigés dans toutes les directions ; à la lumière (2.500 lux), les conidiophores, moins nombreux, sont agencés en un bouquet dense et conique dressé vers la source lumineuse.

3) après une période de dormance, par production d'apothécie : c'est la germination carpogène qui conduit à la formation d'ascospores. Je n'ai pas observé ce type de germination.

Dans mon expérimentation de lutte biologique *in vitro* effectuée dans le but d'inhiber la formation et la germination des sclérotes du pathogène, différentes formes de l'antagoniste, à savoir le filtrat de culture, le mycélium, la suspension aqueuse de conidies ou de fragments mycéliens, ont été appliquées au mycélium du pathogène (en vue d'inhiber la formation de sclérotes) ou aux sclérotes du pathogène (en vue d'inhiber leur germination).

3.1. - METHODES DE CONFRONTATION

3.1.1. - Utilisation du filtrat de culture antagoniste

Le filtrat brut FB de culture de *Myrothecium* sp. (n° 1) a été appliqué, à pH 4,5, à de jeunes cultures du pathogène :

1) âgées de 4 jours dans le but d'inhiber à 22° C l'initiation des sclérotes (1 ml de FB réparti de façon homogène à la surface de la colonie en boîte de Petri sur PCA) ; voir autres renseignements et notamment le mode d'expression des résultats dans le Tabl. 26 et sa légende.

2) âgées de 6 jours dans le but d'inhiber la croissance et la maturation de sclérotes néoformés par dépôt de 0,05 ml de FB sur chaque sclérote (les sclérotes choisis qui ont l'aspect de petits grains blancs ou jaunâtres se trouvent le plus souvent au 2^{e} stade de développement. Pour éviter qu'une grande partie du volume de FB affecté à chaque sclérote ne se perde par dispersion à la surface du milieu PCA, un petit sillon circulaire de 1 mm de largeur et de 1-2 mm de profondeur (sillon destiné à recevoir le FB non absorbé par le sclérote et son environnement immédiat et à le maintenir au voisinage de l'organite) a été creusé autour du sclérote en enfonçant légèrement l'extrémité d'un tube de verre de 8 mm de diam. et de 1 mm d'épaisseur (voir autres renseignements et notamment le mode d'expression des résultats dans le Tableau 26 et sa légende).

Dans le but d'inhiber à 10° C et à 22° C la germination sclérotique de *B. cinerea*, le FB tel quel ou concentré 10 fois de *Myrothecium* sp. (n° 1) et de *Trichoderma* sp. (a) a été appliqué à des sclérotes mûrs, conformément au protocole suivant :

35 à 50 sclérotes sont disposés régulièrement sur une double couche de papier filtre en boîte de Petri ; le papier filtre est alors saturé en filtrat, les sclérotes étant eux-mêmes bien humectés par le filtrat. Chaque

traitement est comparé à deux témoins. Dans le 1^{e} témoin, correspondant au FB ou au FB concentré 10 fois, le milieu de base (RICHARDS) tel quel ou concentré 10 fois remplace le FB ou le filtrat concentré (pH des filtrats de *Myrothecium* sp. (n° 1) = 5,6 ; pH des filtrats de *Trichoderma* sp. (a) = 5,1 ; témoins correspondants ajustés aux mêmes pH). Dans le second témoin, le filtrat est remplacé par de l'eau distillée stérile pH 5,5 (inutile d'indiquer que toutes ces opérations sont effectuées stérilement). Trois boîtes sont préparées par traitement et par témoin. Après 13 jours d'incubation à 10° C ou à 22° C, chaque boîte traitée par un filtrat donné est comparée à ses deux témoins pour déterminer le pourcentage d'inhibition de la germination conidiogène résultant de l'action de ce filtrat.

3.1.2. - Utilisation du mycélium de l'antagoniste

Le mycélium de l'antagoniste a été expérimenté en vue d'inhiber la formation et la germination des sclérotes.

1) essai d'inhibition de la formation des sclérotes à 10° C et à 22° C. Dans ce but, mycélium de l'antagoniste et inoculum du parasite sont repiqués simultanément sur PCA à une certaine distance l'un de l'autre (15 à 25 mm selon le cas). Le mycélium en croissance d'un antagoniste efficient (ex : *Trichoderma* sp. (b)) ne va pas tarder à influencer la colonie parasitaire qui se développe en lui interdisant de différencier des sclérotes (voir autres renseignements concernant le protocole et l'expression des résultats dans les Tableaux 27 , 28 et leurs légendes).

2) essai d'inhibition de la germination des sclérotes à 22° C. Dans ce but, des sclérotes du pathogène sont repiqués, en boîte de Petri, sur le mycélium d'une jeune colonie de l'antagoniste croissant sur PCA (colonie âgée de 3 à 5 jours selon la vitesse de croissance de l'antagoniste). Pour favoriser la germination des sclérotes, ceux-ci sont tenus humectés au moyen d'eau distillée stérile. Le taux d'inhibition de germination des sclérotes est

déterminé comparativement à un témoin. Un mycélium antagoniste actif sur la germination des sclérotes interdit à ceux-ci d'émettre du mycélium et/ou des conidiophores (voir renseignements complémentaires dans le Tabl. 29 et sa légende).

3.2. - RESULTATS

3.2.1. - Résultats de l'action de germes antagonistes sur la formation des sclérotes

3.2.1.1. Action du filtrat brut (FB) de *Myrothecium* sp. (n° 1) (Planche III, Fig. 5,6,7)

La considération du Tabl. 26 me permet d'énoncer que le FB de *Myrothecium* sp. (n° 1) inhibe très fortement (76 % d'inhibition à 22° C, l'initiation des sclérotes de *B. cinerea*.

Quant aux sclérotes néoformés qui se présentent sous la forme d'un petit grain d'aspect cotonneux blanc ou jaune pâle, ils cessent d'évoluer dès que 0,05 ml de FB de *Myrothecium* sp. (n° 1) leur est individuellement appliqué : leur développement est alors irrémédiablement arrêté.

Le FB de *Myrothecium* sp. (n° 1) inhibe donc très fortement l'initiation et totalement la croissance et la maturation des sclérotes.

3.2.1.2. Action du mycélium antagoniste sur la formation des sclérotes (Tableaux 27 et 28, Planche IV, Fig. 8 et 9)

L'étude qualitative et quantitative de cette confrontation me conduit à énoncer les résultats suivants :

1) A 22° C, les sclérotes ensemencés, régulièrement disposés en cercle de 30 mm de diamètre, germent et produisent un mycélium qui colonise rapidement toute la surface de la boîte de Petri située à l'extérieur de ce cercle. Cette colonisation rapide se produit en l'absence ou en présence de l'antagoniste inoculé, je le rappelle, au centre de la boîte et du cercle formé par les sclérotes.

Evaluation	Initiation de sclérotes (1) (cultures âgées de 4 jours au départ)		Croissance et maturation de sclérotes néoformés (2) (cultures de 6 jours au départ)	
	Témoin	Fitrat brut de culture de *Myrothecium* sp. (n° 1) (1 ml/boître de Petri)	Témoin	Filtrat brut de culture de *Myrothecium* sp. (n° 1) (0,05 ml/ sclérote néoformé)
Nombre moyen de sclérotes mûrs	88	21	10	0
Inhibition (%) par rapport au témoin		76 %	-	100 %

Tableau 26 - Action du filtrat brut (FB) de *Myrothecium* sp. (n° 1) sur l'initiation ainsi que sur la croissance et la maturation des sclérotes de *B. cinerea* (S_3).

Le FB provient de cultures de *Myrothecium* sp. (n° 1) âgées de 15 jours ; il a été appliqué, à pH 4,5, aux colonies de *B. cinerea* cultivées sur PCA, colonies sans sclérotes (âgées de 4 jours)) ou ayant des sclérotes néoformés (âgées de 6 jours). Les déterminations ont été effectuées, dans chaque cas, 15 jours après le dépôt du filtrat, sur les cultures incubées à 22° C, à l'obscurité (5 répétitions).

(1) Initiation des sclérotes : il n'y a en moyenne dans une boîte de Petri de 100 mm de diam. traitée par le FB de *Myrothecium* sp. (n° 1) que 24 % de sclérotes initiés par rapport au témoin.

(2) Croissance et maturation de sclérotes néoformés : étude portant sur 10 sclérotes traités (0,05 ml de FB) et 10 sclérotes témoin (0,05 ml de milieu de RICHARDS, pH 4,5) par boîte de Petri (5 répétitions) ; chez tous les sclérotes traités, il y a arrêt de la croissance et absence de maturation.

	Témoin	*Trichoderma* sp.(b)	*Trichoderma* sp.(a)	*Myrothecium* sp.(n°1)
Nombre de sclérotes ormés/boîte de Petri	85	0	37	68
Inhibition (%)	-	100 %	56 %	20 %
Dimensions moyennes es sclérotes : L x l (en mm)	1,70 x 1,25	-	1,05 x 0,70	3,00 x 2,35

Tableau 27- Inhibition de la formation de sclérotes de *B. cinerea* (S_3) au cours d'une confrontation directe, à 22° C, à l'obscurité, avec le mycélium de chacun des trois antagonistes actifs sur la croissance mycélienne à cette température (PCA ; 3 répétitions ; estimation effectuées au bout de 21 jours).

L'antagoniste est ensemencé au centre de chaque boîte de Petri (100 mm de diam.) ; le parasite est ensemencé sous la forme de sclérotes (10 à 15) régulièrement disposés en cercle à 15 mm de l'inoculum de l'antagoniste : ces sclérotes sont principalement mycéliogènes dans les conditions ci-dessus indiquées :

L : longueur moyenne des sclérotes mûrs
l : largeur moyenne des sclérotes mûrs.
} Moyenne établie à partir de 30 sclérotes.

	Témoin	*Trichoderma* sp. (b)	*Trichoderma* sp. (a)	*Fusarium lateritium*	*Gliocladium roseum*	*Epicoccum purpurascens*
Nombre de sclérotes formés par boîte de Petri	36	0	6	21	31	0
Inhibition (%)	-	100 %	83 %	42 %	14 %	100 %

Tableau 28- Inhibition (%) de la formation de sclérotes de *B. cinerea* (S_3) au cours d'une confrontation directe à 10° C, à l'obscurité, avec le mycélium de chacun des cinq antagonistes retenus (28 jours d'incubation sur milieu PCA ; 3 répétitions).

Le parasite est ensemencé sous la forme d'une sclérote au centre de la boîte de Pétri ; immédiatement après 4 disques de gélose (de 4 mm de diam.) recouverts et pénétrés de mycélium antagoniste sont disposés en croix autour du sclérote (chaque inoculum antagoniste étant placé à 25 mm de distance de l'inoculum parasite).

La colonie de *Trichoderma* sp. (a) ou (b), entourée par celles du parasite, produit des hyphes qui sont capables de croître sur le territoire nouvellement occupé par les hyphes de *B. cinerea* ; ces hyphes antagonistes néoformés, proches donc de celles du parasite, inhibent totalement /cas de *Trichoderma* sp. (b)/ ou assez fortement /56 % d'inhibition par *Trichoderma* sp. (a)/ la formation des sclérotes (Tableau 27). A l'action positive bien qu'imparfaite de *Trichoderma* sp. (a) sur la formation des sclérotes s'y ajoute une seconde action tout aussi intéressante de cet antagoniste se traduisant par la réduction de la taille des sclérotes qui parviennent à se former (Tabl. 27, Planche IV, Fig. 8).

2) A la température de 10° C, trois antagonistes montrent une grande efficience : ce sont *Trichoderma* sp. (a) capable de réduire de 83 % le nombre de sclérotes formés par boîte de Petri et surtout *Trichoderma* sp. (b) et *Epicoccum purpurascens* qui inhibent totalement la formation des sclérotes à cette basse température (Tabl. 28). Ainsi donc *E. purpurascens* peu actif sur la croissance mycélienne à 14° C (Tabl. 9) montre à 10° C, sur la formation des sclérotes, une très grande efficacité.

3.2.1.3. Observations complémentaires

1) 0,05 ml d'une suspension aqueuse conidienne (10^6 conidies/ml) de *Gliocladium roseum* appliqué à un sclérote de *B. cinerea* n'interdit pas à ce sclérote d'avoir, à 10° C ou à 22° C, une bonne germination ; mais à l'une ou l'autre température, le mycélium en bonne croissance et rapidement sporifère de l'antagoniste entrave sans l'arrêter le développement mycélien du pathogène : celui-ci, dans ces conditions, se montre incapable de former des sclérotes.

2) Une éventuelle action de composés volatils pouvant être émis par le mycélium antagoniste a été recherchée sur la croissance mycélienne, sur la conidiogènèse et sur la formation des sclérotes du pathogène par utilisation de

la technique de GUPTA et TANDON (1977) ; cette technique consiste à inoculer le pathogène sur PCA, au centre d'une boîte de Petri mise en position de couvercle sur une boîte de même diamètre contenant une colonie bien développée de saprophyte. Sur PCA l'étanchéité de la chambre ainsi constituée étant réalisée par utilisation de ruban adhésif. Parmi les quatre antagonistes les plus actifs sur la croissance mycélienne, à savoir *Myrothecium* sp. (n° 1) et les trois *Trichoderma*, aucun n'exerce à 22° C d'action significative "par vapeur" à l'encontre de la croissance mycélienne et de la conidiogénèse ; seul *Trichoderma* sp. (b) manifeste par émission de composés volatils une action qui se traduit, d'une part, par un retard de formation des sclérotes, d'autre part, par une réduction du nombre de sclérotes formés.

3.2.2. - Résultats de l'action de germes antagonistes sur la germination des sclérotes

3.2.2.1. Action du filtrat de culture antagoniste

Le filtrat brut des cultures de *Trichoderma* sp. (a) et de *Myrothecium* sp. (n° 1) est incapable d'inhiber à 10° C et à 22° C la germination conidiogène de sclérotes placés sur papier filtre à l'humidité relative de 100 %. Le filtrat concentré dix fois de *Trichoderma* sp.(a) est tout aussi inefficace à ces températures ; seul le filtrat concentré dix fois de *Myrothecium* sp. (N° 1) inhibe totalement à l'une ou l'autre température, la germination des sclérotes de *B. cinerea* (Planche V, Fig. 11).

3.2.2.2. Action du mycélium antagoniste

Lorsque le mycélium développé de *Trichoderma* sp. (a) ou (b) ou de *Myrothecium* sp. (n° 1) est directement confronté à des sclérotes de *B. cinerea*, à 22° C, à l'obscurité, la germination conidiogène de ces sclérotes qui normalement se produit au contact du mycélium de *B. cinerea* (témoin), est totalement inhibée (Tabl. 29, Planche V, Fig. 10). Inutile d'insister sur l'importance d'un tel résultat.

	Témoin	*Trichoderma* sp. (a)	*Trichoderma* sp. (b)	*Myrothecium* sp. (n° 1)
Inhibition (%) de germination des sclérotes	0 %(1)	100 %	100 %	100 %

Tableau 29 - Inhibition (%) de la germination des sclérotes de *B. cinerea* (S_3) au cours d'une confrontation directe, à 22° C, à l'obscurité, avec le mycélium antagoniste par dépôt de sclérotes du parasite sur le mycélium développé de l'antagoniste (PCA ; 21 jours d'incubation après dépôt des sclérotes du parasite).

Trichoderma sp. (a) ou (b), à croissance rapide à 22° C, a été inoculé 72 h avant la mise en place des sclérotes du parasite ; *Myrothecium* sp. (n° 1), à croissance plus lente, a été inoculé 120 h avant la mise en place des sclérotes du parasite (5 répétitions)

Position des inoculums du pathogène et de l'antagoniste : voir la légende du Tableau 27 .

(1) au terme de l'expérience, 111 nouveaux sclérotes se sont formés, en moyenne, par boîte de Petri témoin.

Observation complémentaire :

A 5° C, des sclérotes mis à incuber sur papier filtre imbibé d'eau distillée germent par émission de conidiophores assez nombreux. Si l'eau distillée est remplacée par une suspension mycélienne de *Trichoderma* sp. (a) ($1,7 \times 10^6$ fragments mycéliens/ml) mise à coloniser le papier filtre 24 h avant le dépôt des sclérotes, ceux-ci demeurent aptes à germer à 5° C mais montrent alors, par comparaison au témoin, une conidiogénèse retardée et fort réduite en intensité (Pl. V , Fig. 12).

3.3. - CONCLUSION

Les résultats positifs les plus marquants de la série de tests relatifs à l'action de germes antagonistes sur la formation et la germination des sclérotes de *B. cinerea* sont consignés dans le Tableau 30 récapitulatif.

Parmi ces résultats positifs, trois faits sont à mon sens particulièrement intéressants car ils pourraient me semble-t-il être assez aisément transposés sur le plan de la pratique agronomique de la lutte biologique ; ces trois faits sont les suivants :

1) l'inhibition totale de formation des sclérotes par application de mycélium de *Trichoderma* sp. (b), à 10° C et à 22° C, ou d'*E. purpurascens*, à 10° C.

2) l'inhibition totale de formation de sclérotes par application de conidies de *Gliocladium roseum* à 10° C et à 22° C.

3) l'inhibition totale de germination des sclérotes par application de mycélium de *Trichoderma* sp. (a), de *Trichoderma* sp. (b) ou de *Myrothecium* sp. (n° 1) à 22° C.

	Forme de l'antagoniste et % d'inhibition de formation des sclérotes	Forme de l'antagoniste et % d'inhibition de germination des sclérotes
Myrothecium sp. (n° 1)	Filtrat brut : 76 % sur l'initiation, 100 % sur la croissance et la maturation à 22° C	Filtrat concentré 10 fois : 100 % à 10° C et à 22° C Mycélium : 100 % à 22° C
Trichoderma sp. (b)	Mycélium : 100 % à 10° C et à 22° C	Mycélium : 100 % à 22° C
Trichoderma sp. (a)	Mycélium : 83 % à 10° C ; 56 % à 22° C	Mycélium : 100 % à 22° C
Epicoccum purpurascens	Mycélium : 100 % à 10° C	
Gliocladium roseum	Conidies : 100 % à 10° C et à 22° C	

Tableau 30- Récapitulation des résultats positifs concernant les inhibitions de formation et de germination des sclérotes de *B. cinerea* par les germes antagonistes étudiés.

CHAPITRE QUATRIEME

ETUDES COMPLEMENTAIRES

4.1. - ACTION ANTAGONISTE COMPAREE A L'ACTION DE FONGICIDES EFFICIENTS CONTRE *Botrytis cinerea*

De nos jours encore, LA COMPOSANTE CHIMIQUE demeure fondamentale dans la lutte contre la pourriture grise de la vigne ; dès lors, il m'a semblé important voire indispensable de juger de l'EFFICACITE RELATIVE des traitements ANTAGONISTES par rapport aux traitements CHIMIQUES usuellement préconisés dans la lutte contre *B. cinerea* : l'action des antagonistes est ici appréciée à la lumière du Procymidone, du Bénomyl et du Mancozèbe.

4.1.1. - Expression numérique des résultats

Fongicides (M/2) / Délais incub. (J)	PROCYMIDONE				BENOMYL				MANCOZEBE			
	4.10^{-4}	4.10^{-5}	10^{-5}	4.10^{-6}	4.10^{-4}	4.10^{-5}	10^{-5}	4.10^{-6}	5.10^{-3}	10^{-3}	4.10^{-4}	4.10^{-}
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	70
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	50

Tableau 31 - Inhibition (%) de la croissance radiale de *B. cinerea* (S_3) au cours d'une confrontation avec le Procymidone, le Bénomyl et le Mancozèbe ; PCA, 22° C, obscurité.

Antagonistes / Délais incub. (J)	*Myrothecium* sp. (n°1)	*Trichoderma* sp. (b)	*Trichoderma* sp. (a)	*Trichoderma viride*
3	100	100	63	39
4	100	100	56	34

Tableau 32 - Inhibition (%) de la croissance radiale de *B. cinerea* (S_3) au cours d'une confrontation avec *Myrothecium* sp. (n° 1), *Trichoderma* sp. (a), *Trichoderma viride* et *Trichoderma* sp. (b) ; PCA, 22° C, obscurité.

4.1.2. - Discussion

Myrothecium sp. (n°1) et *Trichoderma* sp. (b) procurent d'aussi excellents résultats (100 % d'inhibition de la croissance mycélienne du parasite) que ceux induits par le Procymidone et le Bénomyl à toutes les concentrations et par le Mancozèbe, aux doses supérieures ou égales à 4.10^{-4} mole de matière active par litre.

Trichoderma sp. (a) manifeste une efficacité très satisfaisante et tout-à-fait comparable à celle caractéristique du Mancozèbe à la concentration de 4.10^{-5} mole/l (63 et 56 % contre 70 et 50 % d'inhibition respectivement après 3 et 4 jours d'incubation) ; encore que le traitement antagoniste extériorise une rémanence relativement plus intéressante que celle du Mancozèbe usite à la concentration précitée.

Enfin, *Trichoderma viride* révèle une efficacité nettement inférieure à celle des traitements précédents, tout au moins sous les conditions d'expérimentation qui ont été les miennes.

4.2. - TEST *in vitro* DE COMPATIBILITE DES ANTAGONISTES AVEC LES FONGICIDES USITES EN VITICULTURE

Outre l'action de *B. cinerea*, la vigne est soumise à de nombreuses affections parasitaires telles le mildiou (*Plasmopara viticola*), l'oïdium (*Uncinula necator*), les tordeuses de grappes (*Cochylis* et *Eudemis*) etc... ; ces affections sont de nos jours couramment combattues par divers pesticides dont je me propose d'évaluer l'influence réelle sur la population des germes antagonistes ; en l'occurence j'ai examiné le comportement *in vitro* de *Myrothecium* sp. (n° 1) et de *Trichoderma* sp. (a) au cours et au terme d'une confrontation avec le Procymidone, le Bénomyl et le Mancozèbe.

4.2.1. - Expression numérique des résultats

Traitements chim. / Doses (M/l)	PROCYMIDONE			BENOMYL			MANCOZEBE		
	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Myrothecium sp. (n°1)	47	25	3	100	76	14	31	6	1
Trichoderma sp. (a)	26	22	8	100	42	22	46	28	22

Tableau 33 - Inhibition (%) exercée par le Procymidone, le Bénomyl et le Mancozèbe sur la croissance mycélienne de *Myrothecium* sp. (n° 1) et de *Trichoderma* sp. (a) après 11 et 3 jours de confrontation ; PCA, 24° C, obscurité.

4.2.2. - Discussion

Il est à noter que les délais d'incubation différents sont étroitement conditionnés par la biologie propre à chacun des germes antagonistes.

Seul le Bénomyl à la concentration de 10^{-4} M/l inhibe totalement la croissance mycélienne des deux antagonistes.

Le Procymidone aux concentrations supérieures ou égales à 10^{-5} M/l de même que le Mancozèbe à 10^{-4} M/l, exercent une inhibition non négligeable sur la croissance mycélienne des antagonistes : taux d'inhibition variant de 22 à 76 %.

Trichoderma sp. (a) se révèle nettement plus sensible à l'inhibition exercée par le Mancozèbe que *Myrothecium* sp. (n° 1), ce dernier accusant un effet dépressif faible voire négligeable aux faibles concentrations : 6 et 1 % d'inhibition à 10^{-5} et 10^{-6} M/l respectivement.

Enfin -et au vu des résultats codifiés dans le Tableau 33 - on observe que *Myrothecium* sp. (n° 1) /14 % d'inhibition après 11 jours de confrontation/ et *Trichoderma* sp. (a) /22 % d'inhibition après 3 jours de confrontation/ sont nettement moins sensibles à l'action fongitoxique du Bénomyl (dose expérimentale de 10^{-6} M/l) que ne l'est *B. cinerea* (100 % d'inhibition).

4.2.3. - Remarque finale

La vapeur de soufre n'exerce aucune perturbation sur la croissance mycélienne de *Myrothecium* sp. (n° 1) et de *Trichoderma* sp. (a).

4.3. - SYNTHESE

L'analyse comparative de l'inhibition exercéesur le pathogène par les antagonistes et les fongicides de référence a permis de matérialiser le caractère positif des antagonistes fongiques ; cependant, il eut été particulièrement

intéressant de pouvoir approfondir cette démarche par implication de traitements associant soit plusieurs antagonistes (en direct et/ou en différé) soit plusieurs types de fongicides.

Par ailleurs, l'appréhension exhaustive des tests de compatibilité (§ 4.2.) suppose à priori toute une série d'études complémentaires devant circonscrire le comportement intrinsèque de l'antagoniste confronté avec les produits fongicides : variations morpho-physiologiques, devenir du pouvoir antagoniste notamment,etc...

TROISIEME PARTIE

ESSAIS *in vivo* DE LUTTE BIOLOGIQUE

CONTRE *Botrytis cinerea* PERS.

Les conclusions positives matérialisées tout au long de l'étude *in vitro* devront -sous peine d'être inutilisables en agriculture- être consolidées et confirmées au travers d'une expérimentation *in vivo* ; cette nouvelle dimension est certes des plus intéressantes, mais aussi des plus délicates eu égard aux multiples actions et interactions inhérentes aux relations hôte x parasite.

Cependant, les résultats observés *in vitro* m'amènent tout naturellement à m'interroger sur leur reproductibilité *in vivo* ; sans vouloir m'appesantir sur les mécanismes intimes impliqués dans les phénomènes d'antagonisme -ou à fortiori sur les conditions d'application et d'efficacité des méthodes de lutte qui en seraient issues- je me propose d'évaluer l'inhibition (relativement au témoin) exercée *in vivo* par *Myrothecium* sp. (n° 1) et *Trichoderma* sp. (a) sur le développement de la pourriture grise de la vigne.

Dans le chapitre premier, j'essaie très brièvement d'apprécier l'efficacité de traitements incluant *Myrothecium* sp. (n° 1) et *Trichoderma* sp. (a) sur le développement de la pourriture grise sur grappes de raisin, le deuxième chapitre étant consacré à une expérimentation en plein champs.

CHAPITRE PREMIER

INFLUENCE DE TRAITEMENTS ANTAGONISTES SUR LA CONTAMINATION ARTIFICIELLE DE GRAPPES DE RAISIN PAR *Botrytis cinerea*

1.1. - PRELIMINAIRE

Les antagonistes sont appliqués soit en même temps que le parasite (application simultanée) soit 24 h avant l'inoculation des grappes par le parasite (traitement préventif de couverture).

L'incubation est de 11 jours à 20° C (photopériode de 12 heures).

Afin d'éliminer les résidus de pesticides, les grappillons de raisin (variétés Muscat de Hambourg et Mauzac) préalablement lavés à l'eau du robinet sont abondamment rincés à l'eau distillée stérile ; le matériel issu de la variété Muscat est alors désinfecté par immersion (1 mn) dans l'alcool absolu tandis que celui prélevé sur variété Mauzac l'est par immersion (5 mn) dans du chlorure mercurique 2 °/$_{oo}$; ces deux traitements étant suivis par trois rinçages abondants à l'eau distillée stérile.

Les huit traitements suivants ont été utilisés :

To = Témoin absolu

T_1 = *Myrothecium* sp. (n° 1) : suspension conidienne (10^6 conidies/ml) en traitement simultané avec *B. cinerea*.

T_2 = *Myrothecium* sp. (n° 1) : suspension conidienne en traitement préventif par rapport à *B. cinerea*.

T_3 = *Myrothecium* sp. (n° 1) : suspension mycélienne (4.10^5 fragments/ml) en traitement simultané.

T_4 = *Myrothecium* sp. (n° 1) : suspension mycélienne en traitement préventif.

T_5 = *Myrothecium* : conidies (10^6) et Mycélium (17.10^5) en traitement préventif.

T_6 = *Trichoderma* sp. (a) : suspension mycélienne (17.10^5 fragments/ml) en traitement simultané.

T_7 = *Trichoderma* sp. (a) : suspension mycélienne en traitement préventif.

1.2. - EXPRESSION NUMERIQUE DES RESULTATS : DISCUSSION

T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	T_6	T_7
24,4	51,1	32,9	49,1	50,7	23,8	53,6
VARIETE MUSCAT					VARIETE MAUZAC	

Tableau 34 - Inhibition (%) exercée par les traitements antagonistes sur le développement de la pourriture grise sur grappillons de raisin au cours d'une confrontation Directe et Préventive avec *B. cinerea* (S_3) ; 11 jours d'incubation à 20° C, photopériode de 12 h.

De façon générale, les traitements antagonistes de type préventif (T_2, T_4, T_5 sur Muscat et T_7 sur Mauzac) confèrent une meilleure protection des baies contre l'affection par *B. cinerea* ; cette supériorité (taux d'inhibition minimum de 49,1 %) serait liée à la nature qualitative et quantitative des substances émises par les germes antagonistes au cours de leur interaction avec l'hôte, préalablement à toute inoculation par le parasite (Planches VI et VII, Fig. 13, 14, 16 et 17).

Par contre, les mêmes antagonistes en confrontation simultanée avec le pathogène sur grappillons de raisin (T_1, T_3 et T_6) déterminent un taux d'inhibition maximumde 32,9 % : les substances inhibitrices émises seraient en quantité insuffisante et leur remanence n'en serait que plus limitée.

CHAPITRE DEUXIEME

EXPERIMENTATION EN PLEIN CHAMP

2.1. - PRELIMINAIRE

Cet essai a été implanté au domaine de Monlon à partir de variétés Gamay et Mauzac.

Trois types de traitements sont mis en jeu dans cet essai :

- les traitements à base d'un antagoniste seul : mélange volume à volume de suspensions conidienne (12.10^5 conidies/ml) et mycélienne (4.10^5 fragments/ml) de *Myrothecium* sp. (n° 1) ; suspension mycélienne de *Trichoderma* sp. (a) à raison de 17.10^5 fragments/ml.

- les traitements associant deux antagonistes.

- les traitements associant l'un ou l'autre des germes antagonistes avec un fongicide usuel dans la lutte contre la pourriture grise de la vigne.

Par ailleurs, les traitements sont effectués aux quatre stades physiologiques suivants :

- chute des capuchons,
- fermeture de la grappe
- début nouaison
- trois semaines avant récolte.

La nature précise des traitements (à raison de 150 ml/pied de vigne) est codifiée comme suit :

To = Témoin absolu

T_1 = Témoin de référence : Procymidone 50 % M.A. à raison de 3,4 g/l

T_A = 1^e, 2^e, 3^e et 4^e pulvérisations à base de *Myrothecium* sp. (n° 1)
T_B = 1^e, 2^e, 3^e et 4^e pulvérisations à base de *Trichoderma* sp. (a)
T_C = 1^e et 3^e pulvérisations avec *Myrothecium* sp. (n° 1) et 2^e et 4^e pulvérisations avec *Trichoderma* sp. (a)
T_D = les 1^e et 3^e pulvérisations à base de Procymidone ; les 2^e et 4^e à base de *Trichoderma* sp. (a)
T_E = les 1^e et 3^e pulvérisations à base de *Myrothecium* sp. (n° 1) et les 2^e et 4^e à base du témoin absolu (To).
T_F = les 2^e et 4^e traitements à base de *Trichoderma* sp. (a) et les 1^e et 3^e à base du témoin absolu (To).

NB = Les rendements (kg par parcelle élémentaire moyenne) correlatifs de ces divers traitements sont également codifiés dans les colonnes correspondantes.

2.2. - EXPRESSION NUMERIQUE ET GRAPHIQUE DES RESULTATS

Traitements / Paramètres utilisés	To	T_1	T_A	T_B	T_C	T_D	T_E	T_F	Traitements / Entrées
Inhibition (%)	0	96	51	25	13	(-)	19	21	GAMAY
Rdt (kg)	5,95	8,90	5,91	6,60	6,60	(-)	6,63	7,55	
Inhibition (%)	0	74	29	16	(-)	32	13	8	MAUZAC
Rdt (kg)	9,11	9,97	8,92	9,52	(-)	10,64	9,30	7,02	

Tableau 35 - Examen comparatif de l'inhibition (% de To) exercée *in vivo* (et estimation des rendements correlatifs) sur le développement de la pourriture grise par les traitements sus-définis.

N.B. = (-) : Données non disponsibles.

L'expression graphique de ces résultats est représentée sur les figures 13 et 14 .

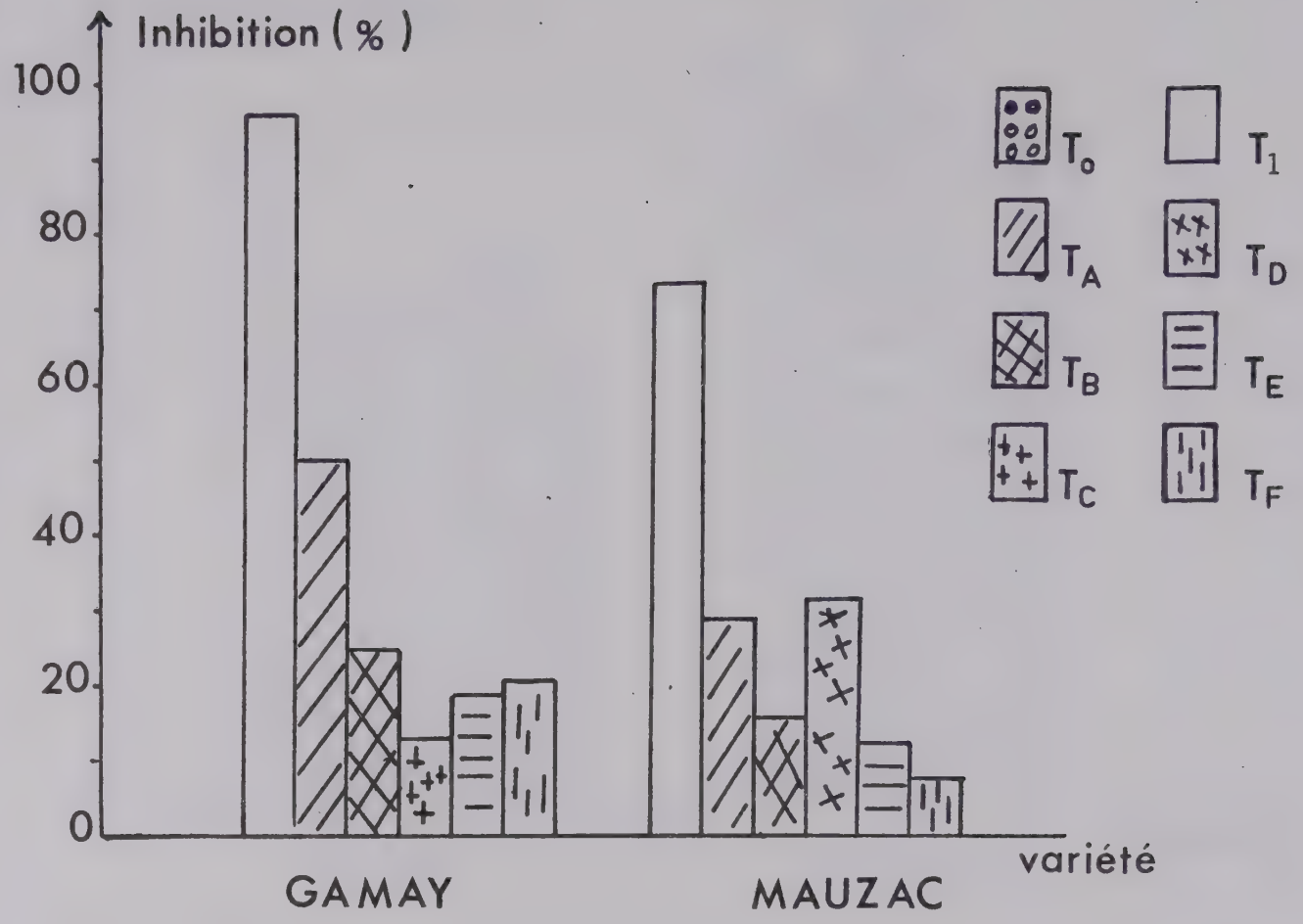


Figure 13 - Examen comparatif de l'inhibition (% du témoin) exercée *in vivo* sur le développement de la pourriture grise par les traitements sus-définis.

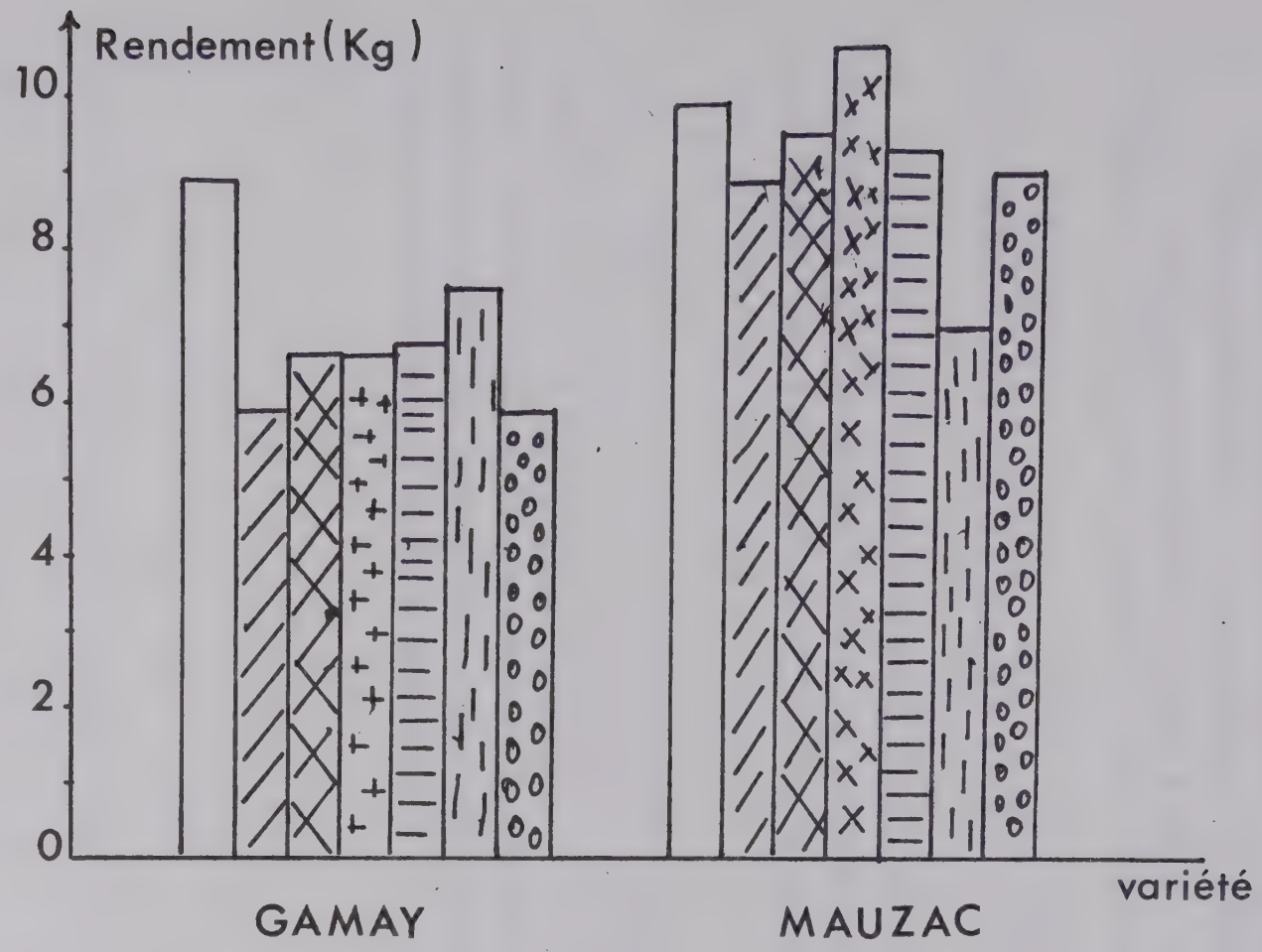


Figure 14 - Estimation des rendements (kg par parcelle élémentaire moyenne) corrélatifs à l'inhibition exercée *in vivo* par les traitements susdéfinis sur le développement de la pourriture grise.

2.3. - DISCUSSION

Quoique d'efficacité non négligeable, l'inhibition exercée par les traitements antagonistes ou ceux associant les antagonistes entre eux ou avec le Procymidone est nettement inférieure à celle caractéristique du Procymidone intervenant seul aux quatre stades d'application (cf fig. 13).

Relativement au rendement (cf. fig. 14) cependant, on observe que la suprématie du Procymidone est nettement moins tranchée que précédemment.

Les seuils de rendement observés sur Mauzac sont relativement supérieurs à ceux caractéristiques de Gamay, ce qui témoigne d'une meilleure résistance de ce cépage, à moins que la différence observée ne soit imputable aux seules potentialités intrinsèques de Mauzac.

Dans l'ensemble, cet essai qui s'est avéré somme toute positif, mériterait d'être poursuivi pour une meilleure circonscription des dimensions importantes telles la fréquence des traitements, les associations de traitements, les doses d'utilisation, les correlations rendement x pression de sélection et aussi, les aspects liés aux mécanismes impliqués dans les interactions des composantes du triangle pathologique.

CHAPITRE TROISIEME

INCIDENCE DE L'APPLICATION *in vivo* DE TRAITEMENTS ANTAGONISTES SUR LA FERMENTATION DU MOUT

3.1. - PRELIMINAIRE

Dans ce paragraphe, je me propose de cerner l'incidence (néfaste ou bénéfique) exercée par les traitements antagonistes appliqués préalablement sur la technologie du vin, notamment sur l'intensité de la fermentation du moût inoculé ou non par *Saccharomyces cerevisiae*.

L'intensité de la fermentation est matérialisé par le profil thermique caractéristique de chaque unité de fermentation.

Les six unités de fermentation (15 l de moût par unité) ci-dessous correspondent respectivement à six traitements précis appliqués sur variété Gamay aux stades CHUTE DES CAPUCHON, FERMETURE DE LA GRAPPE, VERAISON, TROIS SEMAINES AVANT LES VENDANGES ; ces unités pouvant ou non être inoculées par la souche UG_5 de *S. cerevisiae*.

Les traitements employés sont les suivants :

To = Moût issu de pieds témoins (traitement par l'eau distillée stérile)

To'= Moût issu de pieds témoins avec adjonction de UG_5 avant incubation

T_1 = Moût issu de pieds préalablement traités par *Myrothecium* sp. (n°1)

T_2 = Moût issu de pieds préalablement traités par *Myrothecium* sp. (n°1) avec adjonction de UG_5 avant incubation.

T_3 = Moût issu de pieds préalablement traités par *Trichoderma* sp. (a)
T_4 = Moût issu de pieds préalablement traités par *Trichoderma* sp. (a) avec adjonction de UG_5 avant incubation.

3.2. - RESULTATS

Traitements (Tc) / Délais incubat. (H)	To	T_1	T_3	To'	T_2	T_4
13	22	22	22	22	22	22
16	22,5	22,5	22	22,5	22,5	22,5
19	22,5	22,5	22,5	22,5	22,5	22,5
22	23	23	22,5	23	23	23
38	23,5	24	24	25	25,5	26
42	24	24	24	25	26	26
46	24	25	25	25	26	26
62	25	25,5	25,5	24,5	25	25
70	25	25,5	25,5	24,5	24	25
86	24	23	23,5	23,5	23	23
94	23,5	23	23	23,5	22,5	22,5

Tableau 36 - Cinétique (profil thermique en °C) de la fermentation du moût de raisin : Variété Gamay préalablement soumise ou non à l'action de *Myrothecium* sp. (n° 1) et de *Trichoderma* sp. (a) en présence ou absence de la souche UG_5 de *S. cerevisiae* ; incubation à l'obscurité.

3.3. - DISCUSSION

Dans tous les cas, l'adjonction de UG_5 active la fermentation (cf. To par rapport à To').

La comparaison des traitements T_1 et T_3 avec ceux caractéristiques du témoin correspondant (To) révèle un effet bénéfique (activation de la fermentation) induit par les traitements à base de *Myrothecium* sp. (n° 1) et *Trichoderma* sp. (a) : Elévation thermique à 25° C au bout de 46 heures seulement pour T_1 et T_3 contre 62 heures pour To.

Examinés à la lumière des effets liés à To', les traitements T_2 et T_4 extériorisent la même tendance bénéfique, matérialisée par une température de 26° C entre 42 et 46 heures pour *Myrothecium* sp. (n° 1) + UG_5 et entre 38 et 46 heures pour *Trichoderma* sp. (a) + UG_5.

Enfin et à l'image de To comparé à To', on observe que l'adjonction de levure UG_5 (T_2 et T_4) induit une intensification de la fermentation.

REMARQUES ET CONCLUSION

Il n'était pas de mon intention d'appréhender exhaustivement le problème combien complexe et non moins fondamental de l'expérimentation *in vivo* ; guidé par une démarche prospective, j'ai simplement voulu révéler certaines dimensions qui me sont parues intéressantes sans toutefois pouvoir m'appesantir sur les composantes intrinsèques constitutives ; l'association d'expériences faites au laboratoire avec des essais bien conduits en plein champ permettront sans aucun doute d'approfondir et de mieux cerner les aspects importants tels : Nature des traitements, conditions biotiques et cosmiques de leur utilisation et de leur efficacité *in vivo*, mécanismes d'action, incidence globale sur la technologie et les qualités organoleptiques du vin et sur le consommateur.

Je m'en tiendrai là pour cette partie ; par ces remarques, j'ai seulement voulu matérialiser l'importance du chemin parcouru afin de mieux révéler l'ampleur de la portion à parcourir (d'un point de vue scientifique, technique, financier et pourquoi pas social) avant que la lutte biologique SOIT.

DISCUSSION GENERALE

Au terme de ce mémoire, je me permets de rappeler, à la lumière des résultats principalement obtenus *in vitro*, les composantes du mode d'action de chacun des antagonistes jugés efficients :

Myrothecium sp. (n° 1) : action essentiellement à distance par émission de composés toxiques thermostables.

Trichoderma sp. (a) : action principale de contact accompagné d'une action par émission de toxines thermolabiles.

Trichoderma sp. (b) : action principale de contact accompagnée d'une action par émission de composés toxiques essentiellement volatils.

Trichoderma viride : action principale de contact, action secondaire à distance.

Epicoccum purpurascens : action principale de contact accompagnée d'une action par émission de composés toxiques.

Gliocladium roseum : faible action de contact ; activité biochimique se traduisant par l'inhibition de la formation des sclérotes.

In vitro, les actions de ces divers antagonistes s'effectuent à différents niveaux du cycle de *B. cinerea* : la Figure 15 qui fait le bilan de toutes ces actions porte indication pour chaque processus affecté, des antagonistes incriminés et du niveau d'efficience de leur forme active.

L'activité inhibitrice de champignons assez proches de ceux que j'ai expérimentés, a fait l'objet d'études nombreuses (*E. purpurascens* : BAMFORD, NORRIS et WARD, 1961 ; *G. roseum* : BRIAN, CURTIS, HOWLAND, DEFFERYS et RADUWITZ, 1951 ; MAKKONEN, POHJAKALLIO, 1960 et BARNETT et LILLY, 1962 ; *Myrothecium* sp. : BAMBURG, MARASAS, RIGGS, SMALLEY et STRONG, 1968 ; *Trichoderma* spp. : DENNIS et WEBSTER, 1971 a,b,c ; voir aussi les revues bibliographiques de MOREAU, 1974 et de PURCHASE, 1974).

L'action essentiellement télétoxique de *Myrothecium* sp. (n° 1) est une action forte, immédiatement et longtemps perçue, par production d'antibiotiques thermostables ; parmi les composés actifs de cet antagoniste, la présence de molécules de type scirpénique déjà notée chez des *Trichoderma*, *Fusarium*, *Cephalosporium* et *Myrothecium* (BAMBURG et col., 1968) n'est pas à écarter ; des expériences biochimiques et cytologiques sont à effectuer pour identifier les composés actifs de *Myrothecium* sp. (n° 1) et préciser leur site d'action primaire dans la cellule.

L'action de contact de *T. viride* paraît moins affirmée sur *B. cinerea* que sur *Pyricularia oryzae* (SY, ALBERTINI et HAMANT 1978a), sur *Helminthosporium turcicum* (MICKALA-DOUKAGA, ALBERTINI et PETITPREZ, 1978) et sur *Rhizoctonia solani* (DENNIS et col. 1971c).

Les actions de contact des *Trichoderma* spp. (a) et (b) sont supérieures à celles de *T. viride* sur *B. cinerea* ; elles ne sont cependant pas aussi marquées que celles de *T. harzianum* sur *H. turcicum* (MICKALA-DOUKAGA et col., 1978) et de *T. viride* sur *R. solani* (DENNIS et col., 1971c), ces dernières actions se traduisant par l'enroulement d'une ou plusieurs hyphes de l'antagoniste autour d'une hyphe du pathogène. Mais il ne faut pas omettre qu'à côté de leur action de contact, les *Trichoderma* spp. (a) et (b) présentent une action par émission de composés antibiotiques thermolabiles (en partie volatils chez *Trichoderma* sp. (b) ; ces actions télétoxiques

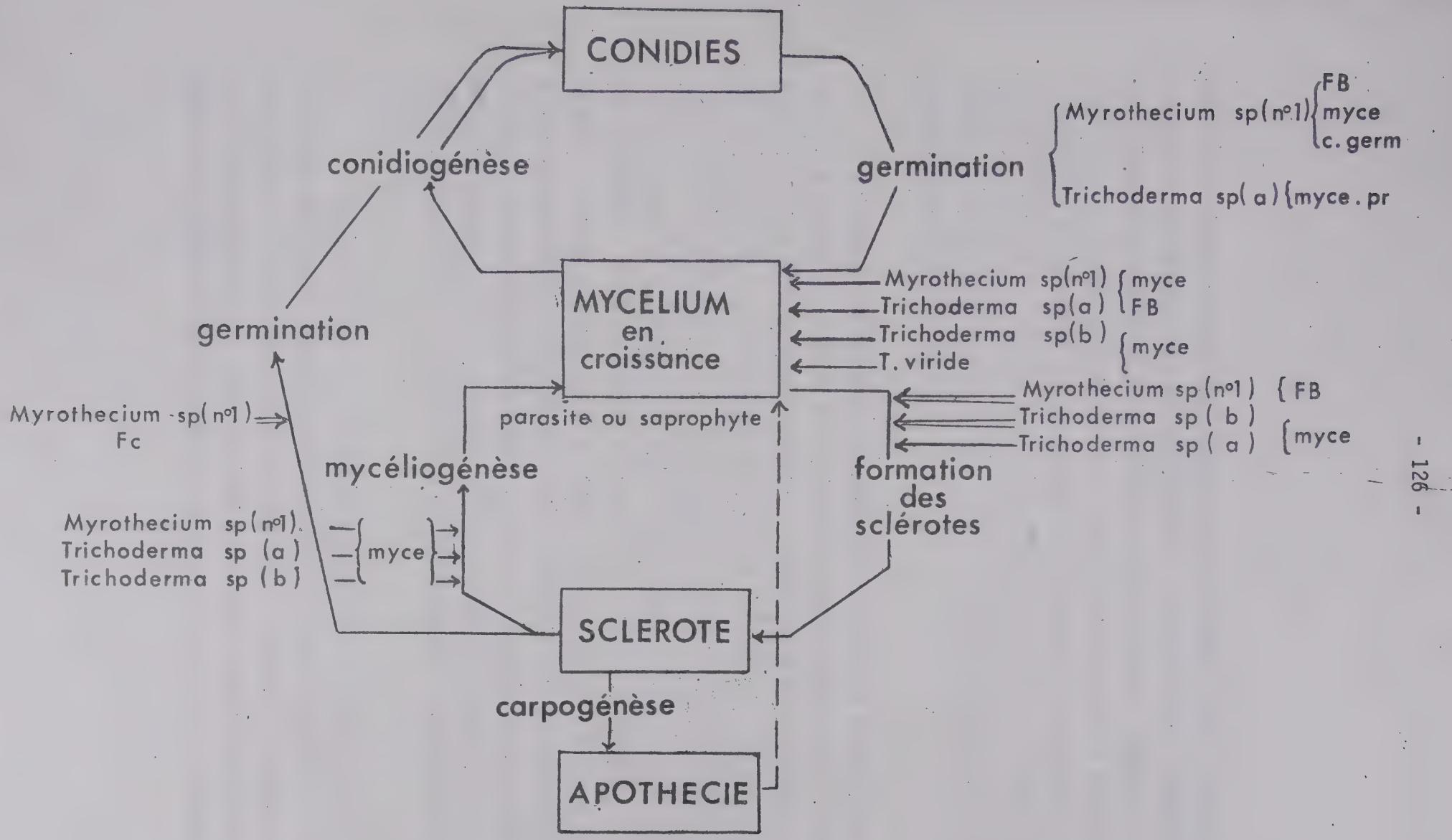


Figure 15 - Bilan des actions antagonistes fongiques efficients sur *B. cinerea* parcourant son cycle *in vitro*.
Flèche à trait double : action très remarquable - Flèche à trait simple : action satisfaisante.
Myce : mycélien ; my.pr : mycélium préincubé ; c. germ. : conidies germées ; FB : filtrat brut ; Fc : filtrat concentré.

sont loin d'être négligeables puisqu'elles induisent, entre autres, une altération du contenu des cellules hyphales (rétraction du protoplasme qui se fragmente en masses hypercolorables, vacuolisation). Cependant, si l'action des *Trichoderma* spp. (a) et (b) s'apparente sur le plan cytologique à celle des *Trichoderma* mis en présence de *R. solani* et de *Fomes aunosus* par DENNIS et col. (1971c), elle s'en sépare sur le plan morphologique puisque les *Trichoderma* spp. (a) et (b) provoquent une hyporamification des hyphes de *B. cinerea* alors que les *Trichoderma* des auteurs induisent une hyperramification des hyphes.

Quant à l'action de composés volatils mis en évidence chez *Trichoderma* sp. (b) à propos de l'étude de la formation des sclérotes de *B. cinerea* elle constitue à mon sens la composante essentielle de l'action à distance de ce saprophyte : le caractère volatil des composés actifs de l'antagoniste permet d'expliquer les résultats positifs du test à la cellophane (les composés s'incorporent alors tout naturellement à la gélose sur laquelle on place ensuite le parasite sans autre intervention) et les résultats négatifs des différents tests utilisant le filtrat de culture (par perte des composés volatils lors de la filtration à froid). J'ajoute que la mise en évidence d'une production d'antibiotiques volatils émis par un antagoniste et actifs contre un champignon phytopathogène, n'est pas une nouveauté puisqu'elle a déjà été notée par DENNIS et col. (1971b) et GUPTA et TANDON (1977) respectivement chez plusieurs *Trichoderma* et *Streptomyces* antagonistes notamment de *R. solani*.

Non seulement le filtrat de culture de *Trichoderma* sp. (b) n'agit pas comme antagoniste mais encore il stimule le développement de *B. cinerea* (Fig. 11) et il le stimule d'autant plus qu'il a subi le traitement thermique (104° C pendant 30 mn) ; une autre observation va dans le même sens : la suspension sporale préincubée de *Trichoderma* sp. (b), non seulement n'inhibe

pas la germination proprement dite des conidies du parasite, mais encore favorise l'élongation des tubes germinatifs émis (Tableau 24). Dans ces deux types d'expérience, on assiste donc, à mon sens, avec le départ de composés volatils actifs, à la détoxication du milieu et au démasquage de molécules à rôle trophique. Ces molécules résultent peut-être, dans le filtrat ou dans le milieu, de la dégradation et/ou de la restructuration de composés émis par *Trichoderma* sp. (b), de tels phénomènes étant vraisemblablement favorisés par la chaleur, mais aussi peut-être par la présence du pathogène : le phénomène de détoxication de fongicides ou d'antibiotiques par des champignons est en effet connu depuis plusieurs décennies ; à titre d'exemple, citons le cas de *Saccharomyces cerevisiae* qui est capable de convertir un antimétabolite, la déthiobiotine, en biotine stimulant sa croissance (WOOLLEY, 1952). Bien utilisé, *Trichoderma* sp. (b) doit néanmoins pouvoir présenter un intérêt certain par sa forte action de contact et par l'émission de ses antibiotiques efficaces et volatils (antibiotiques incapables de s'accumuler et donc de provoquer, par exemple, un phénomène de phytotoxicité sur hôte végétal "traité" par l'antagoniste).

Je remarque que le phénomène de synergie qui se manifeste avec la plus grande netteté dans certains cas d'antibiose (ex : inhibition de *Phytophthora cinnamomi*, MIRCETICH, 1970) n'apparaît vraiment significatif pour aucun des couples d'antagonistes testés en confrontation directe sur la croissance mycélienne radiale de *B. cinerea* (Tabl. 11) ; un tel résultat demande à être confirmé par ceux que permet d'obtenir l'application d'autres techniques de confrontation telles que la confrontation différée sur milieu solide, l'association des confrontations directe et différée sur milieu solide, la confrontation différée en milieu liquide ; en outre, l'action synergique d'antagonistes associés devra être recherchée non seulement sur le mycélium en croissance mais aussi sur les conidies et les sclérotes mis à germer.

Il est bien connu que l'action inhibitrice d'antagonistes sur le développement de parasites varie en fonction de la température et du pH (AYTOUN, 1953 ; PERSSON-HÜPPEL, 1963 ; DENNIS et col., 1971 a ; SY et col., 1978 a ; MICKALA-DOUKAGA et col., 1978 et mes propres observations). Dans mon étude, le pH (entre 4 et 7) semble avoir une influence nettement moins marquée que la température (entre 14° C et 25° C). En effet à pH compris entre 4 et 7, chacun des trois antagonistes efficients [*Trichoderma* spp. (a) et (b), *Myrothecium* sp. (n° 1)] montre une activité optimale ou assez peu déprimée par rapport à son optimum d'activité tant sur la croissance mycélienne que sur la germination conidienne. En fonction de la température, si sur la croissance mycélienne ces mêmes antagonistes sont très efficaces à 22° C ou à 25° C (Tabl. 9 et 18), ils le sont beaucoup moins aux températures plus basses (10° C à 14° C) (Tabl. 9) ; or, à 10° C-14° C, et même à des températures plus basses (6° C-8° C) autorisant encore la croissance du pathogène, un arrêt du développement parasitaire doit être recherché car il ne faut pas oublier que de telles températures favorisent l'infection (BAKER, MATKIN et DAVIS, 1954). Un tel arrêt devrait pouvoir être obtenu par l'utilisation d'autres antagonistes à sélectionner parmi les champignons, mais aussi parmi les bactéries et les actinomycètes. Il sera, entre autres, intéressant de tenir compte des résultats anciens de NEWHOOK (1951 et 1957) et de WOOD (1951) selon lesquels, outre des champignons, des bactéries et des actinomycètes sont capables de réduire les attaques de *B. cinerea* sur feuilles de laitue ou sur jeunes fruits de tomate, le nombre d'espèces antagonistes étant grand à 25° C, nettement amoindri à 15° C et très limité à 4° C-5° C ; à titre indicatif, citons l'activité significative *in vivo* d'un *Bacillus* sp. et d'*Escherichia coli* à 15° C et d'un *Pseudomonas* à 4° C (NEWHOOK, 1951). Plus récemment encore, la fonction antagoniste tenue par des bactéries à l'encontre de *B. cinerea* a été reconnue par BLAKEMAN et FRASER (1971) sur feuilles de chrysanthème ; vivant en association avec les conidies de *B. cinerea*, de telles bactéries sont capables de se multiplier et d'interdire toute germination sporale parasitaire et donc toute infection

foliaire. BLAKEMAN (1972) a pu, en outre, déterminer que le vieillissement de la feuille de betterave au-delà de 9 semaines entraine une libération superficielle d'aminoacides qui favorise la sélection d'un *Pseudomonas* capable d'inhiber la germination des conidies de *B. cinerea*.

J'ai obtenu l'inhibition de la formation des sclérotes aussi bien à basse température (10° C) (par le mycélium de *Trichoderma* sp. (b) ou d'*E. purpurascens*, par les conidies de *G. roseum*) qu'à température plus favorable à la croissance mycélienne de *B. cinerea* (22° C) /par le mycélium de *Trichoderma* sp. (b) et par les conidies de *G. roseum*/ (voir Tabl. 30). J'ai noté, en outre, que le mycélium de *Trichoderma* sp. (a), de *Trichoderma* sp. (b) ou de *Myrothecium* sp. (n° 1) est capable d'inhiber la germination de sclérotes mûrs à 22° C. De tels résultats présentent un intérêt indéniable car leur transposition dans la nature signifierait une fréquence affaiblie (à défaut d'une élimination totale) d'une forme importante de résistance rendue en outre incapable (ou peu capable) de germer : la conséquence en serait la chute de la pression printanière d'inoculum et donc l'observation d'un niveau très amoindri d'attaques primaires.

Si la bibliographie ne répertorie pas, à ma connaissance, de travaux concernant l'action d'antagonistes sur la formation des sclérotes, elle fournit quelques données de parasitisme affectant des sclérotes déjà formés, avec altération possible de leur germination. Voici, à titre indicatif, deux exemples d'antagonistes proches de ceux que j'ai expérimentés et actifs sur sclérotes mûrs : *G. roseum* est capable de se conduire en hyperparasite en colonisant des sclérotes de champignons phytopathogènes (*Sclerotinia sclerotiorum*, *S. borealis*, *B. cinerea*, *Claviceps purpurea*, MAKKONEN et POHJAKALLIO, 1960 ; *Botrytis allü*, *B. squamosa*, WALKER et MAUDE, 1975) et en provoquant leur destruction ou une réduction de leur vitalité ; des souches de *T. viride* peuvent parasiter les sclérotes de *S. sclerotiorum*,

tandis que d'autres, non agressives à l'égard de ce pathogène, attaquent les sclérotes de *S. trifoliorum* et de *S. borealis* (MAKKONEN et POHJAKALLIO, 1960 ; JONES et WATSON, 1969). Je puis faire remarquer que ma souche de *G. roseum* n'empêche pas les sclérotes de germer quasi normalement, mais qu'elle leur interdit, ainsi que je viens de le rappeler, de former de nouveaux sclérotes : quant à mes *Trichoderma* /espèces (a) et (b)/, ils sont, avec *Myrothecium* sp. (n° 1) aptes à inhiber la formation des sclérotes en plus de la germination sclérotique.

Le mycélium et/ou les conidies prégermées (ou non) d'antagonistes /*Myrothecium* sp. (n° 1), *Trichoderma* sp. (a) sur la croissance mycélienne et/ou sur la germination conidienne de *B. cinerea*, se sont montrés efficients *in vivo* contre le pathogène, sur grappe de raisin au laboratoire, notamment en application préventive, et au vignoble par traitement du feuillage et des grappes puisque des réductions d'attaque supérieures ou égales à 50 % ont pu être obtenues avec l'un et l'autre antagoniste principalement par réduction des contaminations. Il ne faut cependant pas ignorer qu'en lutte biologique, la réduction du nombre d'infections constatées *in vivo* par antibiose peut résulter, dans certains cas, d'une action non ressentie par les spores en germination du pathogène et dirigée uniquement sur le développement *in situ* du mycélium pathogénique (ex. : *Aureobasidium pullulans*/ *Helminthosporium sativum* sur seigle : FOKKEMA, 1973 ; levure *Candida*/ *Cochliobolus miyabeanus* sur riz, AKAI et KURAMOTO, 1968).

Mes résultats *in vivo* pour être modestes n'en sont pas moins encourageants ; sans atteindre leur niveau, ils vont dans le sens des résultats obtenus *in vitro*. Ainsi se trouve vérifiée un fois de plus la correspondance notée dans de multiples cas entre les résultats *in vitro* et ceux obtenus *in vivo*. A titre d'exemple, je citerai trois études significatives :

1) *Rhizofus nigricans* qui inhibe *in vitro* la germination conidienne et la croissance mycélienne d'*Alternaria solani*, réduit *in vivo* le nombre de lésions foliaires provoquées par le parasite sur pomme de terre (DAS et PAL, 1968).

2) *Chaetomium globosum*, *Aspergillus japonicus* et *Fusarium oxysporum* qui inhibent *in vitro* la germination des urédospores de *Puccinia penniseti* réduisent aussi *in vivo* le nombre d'urédosores foliaires sur le millet cultivé (KAPOORIA et SINHA, 1969).

3) Les spores ou les filtrats de culture de *Myrothecium roridum*, de *Penicillium notatum* et de *Cladosporium herbarum* qui inhibent *in vitro* la germination des urédospores de *Puccinia graminis tritici* provoquent *in vivo* la disparition ou une très nette réduction des contaminations foliaires du blé sensible à la rouille noire (MISHRA et TEWARI, 1976).

Sachant que nombre de fongicides anti-mildiou (les dithiocarbamates dont le manèbe et mancozèbe, la dichlofluanide) favorisent le développement de *B. cinerea* au vignoble (AGULHON, 1977 ; BOUBALS, DALLAS et MUR, 1977), l'utilisation d'un ou de plusieurs antagonistes efficients [*Myrothecium* sp. (n° 1), *Trichoderma* sp. (a), *Trichoderma* sp. (b)], compatibles avec de tels traitements fongicides (voir 2e partie, chapitre 4e) me semble envisageable (à titre préventif) sur la végétation en remplacement du Procymidone ou de la Vinchlozoline à condition d'avoir résolu les problèmes liés à l'application de la suspension antagoniste (qualité, concentration, conditionnement, dates d'application...) : l'efficience potentielle des antagonistes étant en effet grande notamment vers 20° C-22° C, le tout est de permettre son expression. En outre, l'application d'antagonistes sur les formes de résistance et notamment sur les sclérotes "en formation" ou "mûrs et susceptibles de germer" doit être expérimentée au vignoble en partant des résultats positifs obtenus *in vitro* : aucun des supports potentiels (sarments, souches, feuilles, sol, plantes adventices vivantes ou déssechées) d'éléments de résistance ne doit être négligé.

CONCLUSION GENERALE

Botrytis cinerea Pers. est un champignon de l'ordre des Hyphomycètes /Moniliacées : (forme imparfaite de l'ascomycète *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz./ capable de se manifester sous la forme de pathogène actif dans la quasi totalité des organes aériens de la vigne : feuilles, inflorescences, grappes (rafles et baies), sarments. L'attaque des grappes détermine en plus d'une chute de rendement, une diminution de la qualité du vin produit.

La polyphagie de *B. cinerea*, sa capacité à mener une vie saprophytique (par son mycélium) et à résister par des sclérotes à germination multiforme, sa capacité à émettre de nombreuses conidies aisément libérées et dispersées par la pluie et le vent, font de cet organisme un parasite redoutable doué d'une grande capacité d'adaptation au milieu biologique et aux conditions météorologiques et d'une bonne aptitude à polluer les hôtes.

Dans la 1^{e} partie de mon travail, après une étude générale du cycle de *B. cinerea* sur vigne incluant la description des symptômes, j'ai étudié *in vitro* sur milieux appropriés, l'action de deux facteurs, la température et le pH, sur la croissance mycélienne, la conidiogénèse et la germination des conidies du pathogène.
Croissance mycélienne, sporulation et germination conidienne sont capables de se produire dans de larges intervalles de température et de pH. Cependant si c'est la même zone de pH (4,0 - 4,6) qui autorise le développement optimal de ces trois phénomènes, leurs optima thermiques diffèrent (18° C-21° C pour la germination conidienne, 22° C pour la croissance mycélienne, 25° C pour la conidiogénèse).

La deuxième partie de mon travail est consacrée à la recherche *in vitro* d'antagonistes fongiques dans une perspective de lutte biologique contre *B. cinerea*.

A la suite d'un criblage initial effectué en utilisant un test de confrontation directe mycélium de l'antagoniste-mycélium du parasite, quatre champignons saprophytes [*Myrothecium* sp. (souche n° 1), *Trichoderma* sp. (espèce a), *Trichoderma* sp. (espèce b) et *Trichoderma viride*] ont été retenus pour études détaillées de confrontation avec trois souches (S_1,S_2,S_3) de *B. cinerea*.

Par application de plusieurs techniques de confrontation à 22° C et à pH 4,5-6,1 (confrontation directe sur milieu solide PCA, confrontation différée sur milieu solide (test à la cellophane, filtrat de culture antagoniste incorporé au milieu solide, association des confrontations directe et différée, confrontation différée en milieu liquide de RICHARDS), j'ai montré que la croissance mycélienne de *B. cinerea* est inhibée à différents degrés par les antagonistes. *Myrothecium* sp. (n° 1) agissant par émission de toxines thermostables se classe en tête dans les différents tests. *Trichoderma* sp. (b) agit à la fois par contact (action importante lui permettant d'être 1^{e} au classement des tests de confrontation directe) et par émission de composés antibiotiques vraisemblablement volatils. Supérieur à *T. viride*, *Trichoderma* sp. (a) agit sur le mycélium de *B. cinerea*, principalement par contact, secondairement à distance grâce à l'activité toxique non négligeable d'antibiotiques thermolabiles.

A l'encontre de la germination conidienne de *B. cinerea*, à 22° C, c'est *Myrothecium* sp. (n° 1) qui, à l'évidence, se montre l'antagoniste le plus actif grâce à sa forte activité antibiotique comme en témoignent les tests

utilisant le filtrat de culture, le mycélium non préincubé, les conidies préincubées (pendant 20 h) et même les conidies non préincubées de l'antagoniste ; l'activité antibiotique plus modérée de *Trichoderma* sp. (a) n'est vraiment bien perçue par les conidies mises à germer que lorsque l'antagoniste est appliqué sous la forme de mycélium préincubé (pendant 20 h). Quant à *Trichoderma* sp. (b), il ne parvient à inhiber modérément la germination des conidies de *B. cinerea* que sous la forme de mycélium préincubé, son action antibiotique s'exerçant alors plus sur l'élongation des tubes germinatifs que sur la germination proprement dite.

La formation des sclérotes de *B. cinerea* est totalement inhibée par action du mycélium de *Trichoderma* sp. (b) à 10° C et à 22° C ou d'*Epicoccum purpurascens*, à 10° C et à 22° C ; pour sa part, *Myrothecium* sp. (n° 1) est actif lorsqu'il est appliqué à 22° C sous la forme de filtrat brut qui, d'une part, réduit de 76 % le taux d'initiation des sclérotes, d'autre part, inhibe totalement la croissance et la maturation de sclérotes néoformés. Quant à la germination des sclérotes, elle est totalement inhibée à 22° C par application de mycélium de *Trichoderma* sp. (a), de *Trichoderma* sp. (b) ou de *Myrothecium* sp. (n° 1).

L'effet mycostatique induit sur l'inoculum de *B. cinerea* par un inoculum en gros équivalent en taille d'un germe antagoniste bien adapté aux conditions de milieu imposées, est de niveau équivalent à celui résultant de l'application de fongicides très efficients tels que le bénomyl ou le procymidone (ex. : *Trichoderma* sp. (b) ou *Myrothecium* sp. (n° 1), en confrontation différée dans le test à la cellophane, inhibe totalement la croissance mycélienne de différentes souches (S_1,S_2,S_3) de *B. cinerea* tout comme le bénomyl et le procymidone à 4×10^{-6} M/l, le mancozèbe, moins actif, autorisant la croissance du parasite à 4×10^{-5} M/l). D'autre part, en regard de l'action, déclinante avec le temps, d'un fongicide actif, l'action d'un antagoniste efficace en confrontation directe présente l'avantage de se maintenir, voire de s'accentuer avec le temps par suite d'une émission toxique ininterrompue

et/ou d'une activité hyperparasitaire progressivement affirmée. Il est, en outre, intéressant de noter que des fongicides très utilisés contre différentes maladies de la vigne (bénomyl = oïdium et *B. cinerea* ; procymidone = *B. cinerea* ; mancozèbe = black-rot, excoriose et mildiou) n'altèrent pratiquement pas, lorsqu'on les applique à concentration égale ou légèrement inférieure à 10^{-5} M/l, le développement *in vitro* d'antagonistes tels que *Myrothecium* sp. (n° 1) et *Trichoderma* sp. (a) ; ces deux antagonistes sont, en outre, insensibles aux vapeurs de soufre utilisables contre l'oïdium.

Dans la 3e partie de mon mémoire, j'expose protocoles et résultats de quelques essais *in vivo* de lutte biologique contre *B. cinerea* effectués par application, sur grappes au Laboratoire et sur feuillage et grappes en vignoble, d'antagonistes fongiques /*Myrothecium* sp. (n° 1) et *Trichoderma* sp. (a)/ actifs *in vitro*.

Sur grappes de Muscat de Hambourg au Laboratoire, mycélium et/ou conidies de *Myrothecium* sp. (n° 1) réduisent les attaques de baies de 24 à 33 % en application simultanée antagoniste-parasite, de 50 % environ en application préventive (24 h avant le pathogène) ; sur la variété Mauzac, le mycélium de *Trichoderma* sp. (a) a une action non négligeable en application préventive (54 % d'inhibition).

Sur vigne (cépages sensibles Mauzac et Gamay) la pulvérisation d'une suspension de fragments mycéliens de *Trichoderma* sp. (a) ($1,7 \times 10^6$ fragments/ml) ou d'un mélange de fragements mycéliens (4×10^5/ml) et de conidies ($1,2 \times 10^6$/ml) de *Myrothecium* sp. (n° 1) aux quatre stades de la méthode standard, a permis de noter l'efficacité nette des deux antagonistes (mais assez modeste face à celle du procymidone), *Myrothecium* sp. (n° 1) étant supérieur (29 % et 51 % d'inhibition respectivement du Mauzac et Gamay) à *Trichoderma* sp. (a) (16 % et 25 % d'inhibition).

Sachant que l'activité d'un substrat antiparasitaire vivant ou non varie beaucoup en fonction de la qualité de la préparation, de la qualité et du moment de son application au vignoble, il est certain que des recherches doivent être menées dans les domaines du conditionnement et de la méthodologie d'application des antagonistes fongiques efficients *in vitro*. En outre, la lutte contre les formes de résistance de *B. cinerea* (mycélium perennant et sclérotes) devra être entreprise au vignoble car c'est en négligeant cette lutte qu'on assiste au printemps à une augmentation de la pression d'inoculum par formation, à partir de ces formes de conservation, d'une abondante sporulation aisément polluante.

Mais à côté de cet effort de recherche appliquée effectué en vue d'adapter aux conditions du vignoble les résultats déjà obtenus *in vitro*, l'effort de recherche sur l'aspect fondamental de la lutte contre *B. cinerea* doit être poursuivi et intensifié, plusieurs voies devant être prospectées :

- détection d'autres antagonistes parmi les champignons et recherches sur l'hyperparasitisme fongique pouvant affecter notamment le mycélium et les sclérotes de *B. cinerea*.

- détection d'antagonistes parmi les bactéries et les actinomycètes en vue de lutter essentiellement par action antibiotique contre le pathogène.

- recherche de souches "hypovirulentes" de *B. cinerea*, à mycélium affaibli et/ou incapables de former des sclérotes qui pourraient être utilisées dans le but de réduire l'influence relative des souches agressives et d'abaisser, d'une part, la pression d'inoculum, d'autre part, le nombre et la gravité des infections.

BIBLIOGRAPHIE

AGULHON R. - 1977 - Les fongicides anti-mildiou et le développement de la pourriture grise. Expérimentation en plein champ. Progrès Agricole et Viticole, 94, (10), 312-316.

AKAI S. et KURAMOTO T. - 1968 - Micro-organisms existing on leaves of rice plants and the occurrence of brown leaf spot. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 34, 313-316.

ALBERTINI L., FADDOUL J. et BERDUGO J. - 1972 - Le pH initial du milieu, facteur de variation morphologique des conidies de *Coryneum cardinale*, de *C. beijeirinekü*, d'*Helminthosporium teres* et d'*H. sativum*. Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse, 108, 100-114.

ALBERTINI L., YOKA P. et MIAYOUKOU J.F. - 1974 - Etude de la morphologie des conidies de *Fusarium roseum var. culmorum* et d'*Helminthosporium turcicum* en fonction du pH initial du milieu de culture. Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse, 110, 327-334.

ALE-AGHA N., DUBOS, GROSCLAUDE C., RICARD J.L. - 1974 - Antagonism between non germinated spores of *Trichoderma viride* and *Botrytis cinerea, Monilia laxa M. fructigena* and *Phomopsis viticola*. Plant Disease reporter, 58, 915-917.

ALEXOPOULOS C.J. et Mc INTOSH (A.V. - 1937 - Studies in antibiosis between bacteria and fungi. Ohio J. Sc., 38, 221-235.

ALLEN M.C. et HAENSELLER C.M. - 1936 - Antagonistic action of *Trichoderma* ou *Rhizoctonia* and other soil fungi. Phytopathology, 25, 244-252.

ANDERSON A.L., HENRY C.W. - 1946 - The use of wetting and adhesive agents to inerease the effectiveness of conidial suspension for plant innoculation. Phytopathology, 36, 1056-1057.

ARNOLD R., MOODY et DANIEL GINDRAT - 1977 - Biological control of cucumber black. root. rot by *Gliocladium roseum*. Phytopathology, 67, 1159-1162.

BACKMAN P.A., RODRINGUEZ KABANA R. et WILLIAMS J.C. - 1975 - The effect of peanut leaf spot fungicide on the non target pathogen, *sclerotium rolfsii*.
Phytopathology, 65, /73-776.

BAKER K.F. et COOK R.J. - 1974 - Biological control of plant pathogens.
FREEMAN W.H. et Cy, San Francisco.

BAKER K.F. et MATKIN O.A. et DAVIS L.H. - 1954 - Interaction of salinity injury, leaf age, fungicide application, climate, and *Botrytis cinerea* in a disease Complex of column stock.
Phytopathology, 44, 39-42.

BAMBURG J.R., MARASAS W.F., RIGGS N.V., SMALLEY E.B. et STRONG F.M. - 1968 - Toxic spiroepoxy compounds from *Fusaria* and other hyphomycetes.
Biotechnol. Bioengin, 10, 445-455.

BAMFORD P.C., NORRIS G.L.F. et WARD G. - 1961 - Flavipin production by *Epicoccum spp.*
Trans. Brit. Mycol. Soc., 44, 354-356.

BARNETT H.L. et LILLY V.G. - 1962 - A destructive mycoparasite, *Gliocladium roseum.*
Mycologia 54, 72-79.

BEECH F.W., DAVENPORT R.R. - 1971 - A survey of methods for the quantitative examination of the yeast flora of apple and grape leaves.
Ecology of leaf surface micro-organism, 139-158.

BERDUCOU J. - 1957 - Mécanisme de formation des chances à *Nectria* pommier.
Thèse Doctorat d'Etat, Imprimerie Gomès, Toulouse, 19-58.

BLACKEMAN J.P. - 1972 - Effet of plantage inhibition of *Botrytis cinerea* spores by bacteria on beat root leaves.
Physiol. Plant. Path., 2, 143 152.

BLACKEMAN V.H. et WELDSFORD E.V. - 1916 - Studies in the physiology of parasitism.II- Infection by *Botrytis cinerea.*
Ann. Bot., 30, 389-398.

BLACKEMAN J.P. - 1975 - Germination of *Botrytis cinera in vitro* in relation to nutrient condition on leaf surfaces.
Trans. Brit. Mycol. Soc., 65, (2), 239-247.

BLACKEMAN J.P. et FRASER A.K. - 1971 - Inhibition of *Botrytis cinerea* spores by bacteria on the surface of *chrysanthemum* leaves.
Physiol. Plant. Pathol., 1, 45-54.

BOLLEN G.J. et SCHOLTEN G. - 1971 - Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen.
Neth. J. Pl. Path., 77, 83-90.

BOLLEN G.J. - 1971 - Resistance of benomyl and some chemically related compounds in strains of *Penicillium species*.
Neth. J. Pl. Path., 77, 187-193.

BOLLEN G.J. et FUCHS A. - 1970 - On the specificity of the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of benomyl.
Neth. J. Pl. Path., 76, 299-312.

BOOSALIS M.G. - 1964 - Hyperparasitism.
Ann. Rev. of Phytopathology, 2, 363-376.

BORECKA H. et MILLIKAN D.F. - 1973 - Stimulatory effect of pollen and Pistallate parts of some horticultural species upon the germination of *B. cinerea*.
Phytopathology., 63, 1431-1432.

BRAVERMAN S.W. - 1971 - *Myrothecium* leaf spot of birds foot trefoil.
Phytopathology, 61, 127.

BRAVERMAN S.W. - 1976 - A leaf spot of *Lotus corniculatus* and *Lotus* spp. cause by *Myrothecium verrucaria*.
Plant Disease Reporter, 60, 1065-1068.

BRIAN P.W. et McGOWAN J.C. - 1945 - Viridin : a highly fungistatic substance produced by *Trichoderma viride*.
Nature, 156, 144-145.

BRIAN P.W. et HEMMING H.G. - 1945 - Gliotoxin : a fungistatic metabolic product of *Trichoderma viride*.
Ann. App. Biol., 32, 214-220.

BROADFOOT W.C. - 1933 - Studies on foot ant root-rot of wheat, effect of age of the wheat plant upon the developpement of foot and root-rot.
Canad. J. Research, 8, 483-491.

BRODIE D.S. et BLACKEMAN J.P. - 1975 - Competition for carbon compound by a leaf surface bacterium and conidia of *Botrytis cinera*.
Physiol. Plant. Path., 6, 125-135.

BROWN J.F., SHIPTON W.A., WHITE N.H. - 1966 - The relationship between hypersensitive tissue and resistance in wheat seedlings infected with *Puccinia graminis tritici*.
Ann. Appl. Biology, 58, 2, 279-290.

BOUBALS B., DALLAS J.P., MUR G. - 1977 - Influence de différents fongicides anti-mildiou sur la vulnérabilité des baies de raisin au *Botrytis cinerea*. Recherches de laboratoire. Progrès Agricole et Viticole, 94, (10), 317-325.

CHANG I.P., KOMMEDAHL T. - 1968 - Biological control of seedlings of corn by coating Kernels with antagonisms. Phytopathology, 58, 1395-1401.

CHRISTENSEN J.J. et DAVIES F.R. - 1940 - Variation in *Helminthosporium sativum* induced by a toxic substance produced by *Bacillus mesenterecus*. Phytopathology, 30, 1017-1033.

CLARK C.A. et LORBEER J.W. - 1976 - The developpement of *Botrytis squamosa* and *Botrytis cinerea* on onion leaves as affected by exogenous nutrients and epiphytic bacteria. In : "Microbiology of aerial plant surfaces", DICKINSON C.H. et PREECE I.F. - Edit. Acad. Press, London, New York et San Francisco, 607-625.

COCHRANE V.W. - 1958 - Physiology of fungi. J. Wiley and sons inc. ; London, Chapman et Hall Ltd.

COLLEY-SMITH J.R. et COOKE R.C. - 1971 - Survival and germination of fungal sclerotia. Ann. Rev. Phytopath., 9, 65-92.

CORDON T.C. et HAENSELLER C.M. - 1939 - A bacterium antagonistic to *Rhizoctonia solani*. Soil. Sc., 47, 207-215.

DAINES R.H. - 1937 - Antagonistic action of *Trichoderma* on *Actinomyces scabies* and *Rhizoctonia solani*. Amer. potato jour, 14, 85-93.

DAS C.R. et PAL A. - 1968 - Influence of *Rhizopus nigricans* Ehrenb. on the development of *Alternaria solani* (Ell. et Mart.) Jones et Grout. Phytopath. Z., 63, 40-46.

DENNIS C. et WEBSTER J. - 1971 a - Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc., 57, 25-39.

DENNIS C. et WEBSTER J. - 1971 b - Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc., 57, 41-48.

DENNIS C. et WEBSTER J. - 1971 c - Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interaction. Trans. Br. Mycol. Soc., 57, 363-369.

DIBYADEOBHATT et VAUGHAN E.K. - 1962 - Preliminary investigations on biological control of graymold (*Botrytis cinerea*) of strawberries. Plant. Disease Reporter, 46, 5, 372-374.

DICKINSON C.H. - 1971 - Cultural studies of saprophytes. Ecology of leaf surfaces micro-organisms, 129-139.

DIEM H.G. - 1969 - Micro-organismes de la surface foliaire. II. Interaction entre quelques champignons parasites et divers saprophytes filamenteux de la phyllosphère de l'orge. Bulletin. ENSA Nancy, 11, 12-17.

DIEM H.G. - 1969 - Micro-organismes de la surface des feuilles. III. Effet de la compétition nutritive sur la germination des spores d'une souche d'*Helminthosporium sativum*.

DIEM H.G. - 1974 - Micro-organisms of the leaf surface : estimation of the microflora on the barley phyllosphère. Journal of General Microbiology, 80, 77-83.

DOMMERGUES Y. et MANGENOT F. - 1970 - Ecologie microbienne du sol. Masson Edit., Paris.

DUBOS B. et RICARD J.L. - 1974 - Curative traitement of peach trees against silver leaf disease (*Stereum purpureum*) with *Trichoderma viride* preparation. Plant. Disease Reporter, 58, 147-150.

EHRLICH M.A., EHRLICH H.G. - 1971 - Fine structure of the host-parasite interfaces in mycoparastism. Ann. Rev. of Phytopathology, 3, 155-184.

ELLINGBOE A.H. - 1968 - Inoculum production and infection by foliage pathogens. Ann. Rev. of Phytopathology, 6, 317-330.

ESURUOSO O.F. et WOOD R.K.S. - 1971 - The resistance of spores of resistant strains of *Botrytis cinera*. Ann. Appl. Biology, 68, 271-279.

EVANS E. - 1968 - Plant disease and their chemical control.
Blacknell Scientific publications, Oxford, 241-242.

FAJOLA A.O. et ALASOADURA S.O. - 1975 - Antagonistic effects of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum* causing the damping off disease of tobacco in Nigeria.
Mycologia 57, 47-52.

FLETCHER J.T., SUSAN M. SCHOLEFIELD - 1976 - Benomyl tolerance in isolated of *Botrytis cinerea* from tomato plants.
Ann. Appl. Biology, 82, 529-536.

FOKKEMA N.J. - 1972 - The role of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana (Helminthosporium sativum)* on agar plates and on rye leaves with pollen.
Physiol. Pl. Path., 3, 195-205.

FOKKEMA N.J., LAAR J.A.J. Vande, NELIS-BLOMBERG A.L. et SCHIPPERS B. - 1975 - The buffering capacity of the natural mycoflora of rye leaves to infection by *Cochliobolus sativus* and its succeptibility to benomyl.
Neth. J. Pl. Path., 81, 176-186.

FOKKEMA N.J. et VAN DER MEULEN F. - 1976 - Antagonism of yeast like phyllosphère fungi against *Septoria nodorum* on wheat leaves.
Neth. J. Pl. Path., 82, 13-16.

FOKKEMA N.J. - 1968 - The influence of pollen on the developpement of *Cladosporium herbarum* in the phyllosphère of rye.
Neth. J. Pl. Path., 74, 159-165.

FOKKEMA N.J. - 1971 - Influence of pollen on saprophytic and pathogenic fungi on rye leaves.
Ecology leaf surface micro-organisms, 277-282.

GEOFFRION R. et GOIX J. - 1979 - Le *Botrytis* de la vigne.
Phytoma. Défenseur des cultures, n° 299, 33-35.

GILLES G. - 1959 - Biologie et lutte contre le *Botrytis cinerea* Pers. sur fraisiers.
Höfch Briefe, Ed. franç. 10, 141-168.

GINDRAT D., VANDER HOEVEN E. et MOODY A.R. - 1977 - Control of *Phomopsis sclerotioidæ* with *Gliocladium roseum* or *Trichoderma*.
Neth. J. Pl. Path., 83, suppl. 1, 429-438.

GINDRAT D. et RICARD J.L. - 1976 - Countings techniques for *Trichoderma viride* conidia dispersed in barley flow inoculants.
Plant disease Reporter, 60, 321-325.

GREANEY F.J. et MACHAEK J.E. - 1935 - Studies on the control of the root-rot disease of cereals caused by *Fusarium culmorum* et *Helminthosporium sativum* ; pathogenicity of *H. sativum* as influenced by *Cephalothecium roseum*.
Sc. Agr., 15, 377-386.

GREGORY K.E. et ALLEN O.N. - 1952 - Antibiotics and antagonistic micro-organisms as control agents against damping off of alfalfa.
Phytopathology, 53, 436-440.

GUARINO A.M., MEDLLIO A.B. et DEFEO J.J. - 1968 - Toxic and inflammatory properties of two antibiotics Muconomycin A and B.
Biotech. Bioengin., 10, 457-467.

GUPTA R.C. et TANDON R.N. - 1977 - Growth inhibition of fungi by volatiles from *Streptomyces*.
Trans. Br. Mycol. Soc. 68, 438-439.

HADAR Y., CHET I. et HENIS Y. - 1979 - Biological control of the *Rhizoctonia solani* damping off with wheat bean culture of *T. harzianum*.
Phytopathology, 69, 64-68.

HAWKER L.E. - 1950 - Factors influencing the survival and germination of spores.
Physiology of fungi, 209-234.

HAWKER L.E. - 1950 - Interaction with other fungi and Bacteria.
Physiology of fungi, 269-277.

HORA T.S. et BAKER R. - 1972 - Soil fungistasis. Microflora producing a volatil inhibitor.
Brit. Mycol. Soc. Trans., 59, 491-500.

HORSFALL J.G. - 1956 - Principles of fungicidal action.
Chronica CO. publ. Waltham, Mass., USA, 98-106.

HOWARD H. - 1975 - Effect of pH and sucrose concentration on conidium size and septation in four *Bipolaris species*.
Can. J. Bot., vol. 53, 1457-1464.

HUBERT D.M., ANDERSEN A.L., FINLEY A.M. - 1966 - Mecanisms of biological control in a bean root-rot soil.
Phytopathology, 56, 8, 953.

JENKYN J.F. et PREW R.D. - 1973 - The effect of fungicides on incidence of *Sporobolomyces* spp. and *Cladosporium* spp. on flag leaves of winter wheat.
Ann. Appl. Biology, 75, 253-256.

JOHN P., SLEEMA et CURTLEBEN - 1976 - Microbial antagonists of *Bipolaris maydis*.
Phytopathology, 66, 1214-1218.

JONES D. et WATSON D. - 1969 - Parasitism and lysis by soil fungi of *Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) de Bary, a phytopathogenic fungus.
Nature, 224, 287-288.

KAPOORIA R.G. et SINHA S. - 1969 - Phyllophane mycoflora of pearl millet and its influence on the development of *Puccinia penniseti*.
Trans. Br. Mycol. Soc., 53, 153-155.

KASHJAP U., LEVKINA M. - 1977 - En russe. Effets des micro-organismes isolés de la surface des feuilles des tomates sur la croissance mycélienne des divers champignons phytopathogènes.
Bulletin signalétique, 1978, 380-384.

KELLEY W.D. et RODRINGUEZ KABANA R. - 1976 - Competition between *Phytophthora cinnamomi* and *Trichoderma* spp. in autoclaved soil. Canadian.
Journal of Microbiology, 22, 8, 1120-1127.

KELLEY W.D. - 1977 - Penetration of *Phytophthora cinnamomi* and *Trichoderma* spp. in relation to propagule production in soil cultures at 20° C.
Canadian Journal of Microbiology, 23, 3, 288-294.

KUC J., SHCKLEY G. et KEANEY - 1975 - Protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*.
Physiol. Pl. Pathology, 7, 195-199.

KUSAKARI S., VEYAMA A. - 1975 - Degradation of mycelia of *Pythium aphanidermatun* by lytic *Actinomycetes* in soil.
Trans. Mycol. Soc. of Japan, 16, 1, 55-62.

KUSAKARI S., VEYAMA A. - 1975 - Effet of lytic *Actinomycetes* to several soil borne plant pathogenic fungi.
Trans. Mycol. Soc. of Japan, 16, 1, 63-68.

LAJUDIE J. - 1974 - Mise en évidence des réactions antagonistes chez le *Rhizobium*.
Ann. Phytopathologie, 6, (1), 109-111.

LAST F.T. - 1955 - Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves.
Trans. Brit. Mycol. Soc., 38, (3), 221-239.

LEROUX P. et GREDT M. - 1978 - Etude de l'action antagoniste d'acides gras, de stéroles et de divers dérivés isoprèniques vis-à-vis de quelques fongicides.
Phytopathologishe Zeitschrift, 91 (2), 177-181.
/ Fr, en, de, 8ref., tab/ INRA Versailles, France.

LILLY V.G. et BARNETT H.L. - 1951 - Physiology of fungi.
Mc Graw. Hill Book Compagny, New York, Toronto, London.

LOUIS D. - 1963 - Les modalités de la pénétration du *Botrytis cinerea* Pers. dans les plantes.
Ann. Epiphytes, 14, 57-72.

MACFOY G.A. et SMITH I.M. - 1979 - Phytoalexin production and degradation in relation to resistance of clover leaves to *Sclerotinia* and *Botrytis* spp.
Physiol. Pl. Path., 14, 99-111.

MALL S. - 1976 - *Rhizoctonia* diseases of legume crops as affected by *Trichoderma viride*.
Proceding of the Indian National Science Academy, 41, 6, 559-563.

MATTA A. et GARIBALDI - 1977 - Control of *Verticillium* wilt of tomato by preincubation with avirulent fungi.
Neth. J. Pl. Path., 83, suppl. 1, 457-462.

MICKALA-DOUKAGA E., ALBERTINI L. et PETITPREZ M. - 1978 - Action *in vitro* d'antagonistes fongiques sur la croissance mycélienne de l'*Helminthosporium turcicum* Pass. parasite du maïs.
Bull. Soc. Myc. Fr., 94, 33-47.

MISHRA R.R. et TEWARI R.P. - 1976 - Studies on biological control of *Puccinia graminis tritici*.
Dans : Microbiology of aerial plant surfaces, DICKINSON C.H. et PREECE T.F. édit. Acad. Press, Londres, New York et San Francisco, 559-567.

MOWER R.L., SNYDER W.C. et HANCOCK - 1974 - Biological control of ergot by *Fusarium*.
Phytopathology, 65, 5-10.

NAKHIMOVSKAIA M.I. - 1939 - The influence of bacteria on the germination of rust spores.
Microbiologia (U.S.S.R.), 8, 116-121.

NEWHOOK F.J. - 1951 - Microbiological control of *Botrytis cinerea* Pers. I. The role of pH changes and bacterial antagonism. II. Antagonism by fungi and actinomycetes. Ann. Appl. Biol., 38, 169-184 et 185-202.

NEWHOOK F.J. - 1957 - The relationship of saprophytic antagonism to control of *Botrytis cinerea* Pers. on tomatoes. N.Z.J. Sci. Technol (A), 38, 473-481.

NQUYEN T.H., MATHUR S.B., NEERGAARD P. - 1973 - Seed borne species of *Myrothecium* and their pathogenic potential. Trans. Br. Mycol. Soc., 61, 347-354.

OGURA H., HAYASHI H. - 1974 - On the antagonistic activity of *Trichoderma* spp. to *Fusarium oxysporum*. Research Reports of the Kochi University Agricultural Science 23, 179-186.

OLD K.M. - 1965 - Fungistatic effects of soil bacteria on root rotting fungi with particular reference to *Helminthosporium sativum*. Phytopathology, 55, 901-905.

PARRY K.E. et WOOD R.K.S. - 1958 a - The adaptation of fungi to fungicides : adaptation to copper and mercury salts. Ann. Appl. Biol., 46, 446-456.

PARRY K.E. et WOOD R.K.S. - 1958 b - The adaptation of fungi to fungicides : adaptation to captan. Ann. Appl. Biol., 47, 1-9.

PARRY K.E. et WOOD R.K.S. - 1958 c - The adaptation of fungi to fungicides : adaptation to thiram, ziram, ferbam, nabam and zineb. Ann. Appl. Biol., 47, 10-16.

PERSSON-HÜPPEL A. - 1963 - The influence of temperature on the antagonistic effect of *Trichoderma viride* Fr. on *Fomes annosus* (Fr.) Cke. *Studia forestalia Suecica* 4, 1-13.

POLACH F.J. et MOLIN W.T. - 1975 - Benzimidazole resistant mutant derived from a single ascopore culture of *Botryotinia fuckeliana*. Phytopathology, 65, 902-904.

PORTER C.L. - 1932 - Concerning the characters of certain fungi as exhibited by their growth in the presence of the other fungi. Proc. Indiana Acad. Sc., 41, 149-152.

POTTLE H.W., SHIGO A.L. - 1975 - Traitement of wounds on *Acer rubrum* with *Trichoderma viride*.
European Journal of forest Pathology, 55, 274-279.

POURTOIS A., MARAITE H. et MEYER J.A. - 1976 - Distribution de la tolérance au benomyl dans des populations de *Botrytis cinerea* Pers.
Ann. Phytopathol., 8, 1-8.

PREECE T.F. et DICKINSON C.H. - 1971 - Ecology of leaf surface micro-organisms.
Acad. Press. London, New-York.

PRICE J.A. - 1970 - Properties of the ascorbic acid and oxidase of *Myrothecium verrucaria in vivo*.
Rev. Pl. Path., 49, 3650.

SAR - 1978 - Contribution à l'étude du *Diaporthe phaseolorum* (CKE et ELL) VAR. *sojae*. Biologie. Physiopathologie. Lutte.
Thèse Docteur de 3ème cycle, Institut National Polytechnique de Toulouse, n° 24.

SHARMAN S. et HEALE S. - 1977 - Penetration of carrot roots by the gray mould fungus *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr.
Physiol. Pl. Path., 87, 1063-71.

SHISHIYAMA J., ARAKI F. et AKAI S. - 1970 - Studies on cutin esterase.II. Characteristics of cutin esterase from *Botrytis cinerea* and its activity on tomato-cutin.
Plant. Cell. Physiol., 11, 937-945.

SHOEMARKER P.B. et LORBEER J.W. - 1977 - The role of dew and temperature in the epidemiology of *Botrytis* leaf blight of onion.
Phytopathology, 67, 1267-1272.

SIRIEZ H. - 1979 - Un nouveau fongicide contre la pourriture grise de la vigne.
Phytoma. Défense des cultures, n° 305, 17-21.

STEINER G.W. et LOCKWOOD J.L. - 1970 - Soil fungistasis. Mechanism in sterilized, reinnoculated soil.
Phytopathology, 60, 83-91.

STEVENSON I.L. - 1954 - Antibiotic production by actynomycetes in soil demonstrated by morphological changes induced in *Helminthosporium sativum*.
Nature, 1974, 598-599.

SUNDHEIM - 1977 - Attempts at biological control of *Phomopsis Sclerotioides* in cucumber.
Neth. J. Pl. Path., 83, suppl. 1, 439-442.

SY A.A. - 1976 - Contribution à l'étude de *Pyricularia oryzae* Cav. Morphologie, Biologie et Physiologie. Recherche *in vitro* d'antagonistes dans une perspective de lutte biologique. Thèse Docteur-Ingénieur, Université Paul Sabatier Toulouse n° 534.

SY A.A., ALBERTINI L. et HAMANT Cl. - 1978 a- Recherches sur la lutte biologique contre le *Pyricularia oryzae* Cav. I. Action *in vitro* d'antagonistes fongiques sur la croissance mycélienne du parasite.
Rev. Gén. Bot., 85, 63-81.

SY A.A., ALBERTINI L. et HAMANT Cl. - 1977 - Influence du pH sur la croissance mycélienne, la conidiogénèse et la germination des conidies du *Pyricularia oryzae* Cav.
Bull. So. Hist. Nat. Toulouse, 113, 200-211.

TRONSMO A. et DENNIS C. - 1977 - The use of *Trichoderma* spp to control strawberry fruits rots.
Neth. J. Pl. Path. 8, suppl. 1, 449-455.

TRONSMO A. et RAA J. - 1977 - Antagonistic action of *Trichoderma speudokoningii* againts the apple Pathogen *Botrytis cinerea*.
Phytopath. Z, 89, 216-220.

TYNER L.E. et Mc KINNON B.A. - 1963 - Fungi of barley seed and their associative effects.
Phytopathology, 54, 506-508.

VAN DEN HEUVEL J. - 1969 - Effects of *Aureobasidium pullulans* on numbers of lesions on dwarf bean leaves caused by *Alternaria zinniae*.
Neth. J. Pl. Path., 75, 300-307.

VAN DEN HEUVEL J. - 1971 - Antagonism between pathogenic and saprophytic *Alternaria species* on bean leaves.
In : PREECE T.F. et DICKINSON C.H. : Ecology of leaf surface micro-organisms.
Acad. Press edit., London et New-York, 537-544.

VAN DEN HEUVEL J. - 1970 - Antagonistic effects of epiphytic micro-organism on infection of dwarf bean leaves by *Alternaria zinniae*.
Phytopathologish Laboratorium Willie commelin Scholten Baarn Mededeling, n° 8 = 84.

VERHOEFF K. et JUDITH M. WARRENT - 1972 - *In vitro* and *in vivo* production of cell vall degrading enzymes by *Botrytis cinerea* from tomato.
Neth. J. Pl. Path., 78, 179-185.

VERHOEFF K et LIEM J.L. - 1978 - Presence of Endo-Polygalacturonase in conidia of *Botrytis cinerea* before and during germination. Phytopath. Z., 91, 110-115.

WARKSMAN S.A. et WOODRUFF H.B. - 1941 - *Actinomycetes antibioticus*, a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. J. Bact., 42, 231-249.

WALKER J.A. et MAUDE R.B. - 1975 - Natural occurrence and growth of *Gliocladium roseum* on the mycelium and sclerotia of *Botrytis allü*. Trans. Br. mycol. Soc., 65, 335-337.

WARREN R.C. - 1972 - The effect of pollen on the fungal leaf microflora of *Beta vulgaris* L. and on infection of leaves by *Phoma betae*. Neth. J. Pl. Path., 3, 89-98.

WELLS H.D., WELL D.K. et JAWORSKI C.A. - 1972 - Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology, 62, 442-447.

WHITE G.A. et SMITH F.G. - 1962 - Ascorbic oxidase of *Myrothecium verrucaria* Plant Physiology, 37, 6 pp, 742-750.

WILLETTS H.J. - 1978 - Sclerotium formation. In : The filamentions fungi, vol. 3, SMITH J.E. et BERRY D.R. edit., 197-213.

WOOD R.K.S. et TVEIT M. - 1955 - Control of plant diseases by use of antagonistic organisms. Bot. Rev., 21, 441-492.

WOOD R.K.S. - 1951 - The control of diseases of lettuce by the use of antagonistic organisms. I. The control of *Botrytis cinerea* Pers. Ann. Appl. Biol., 38, 203-216.

WOOLLEY D.W. - 1952 - A study of antimetabolites. WILEY edit., New-York, 269 p.

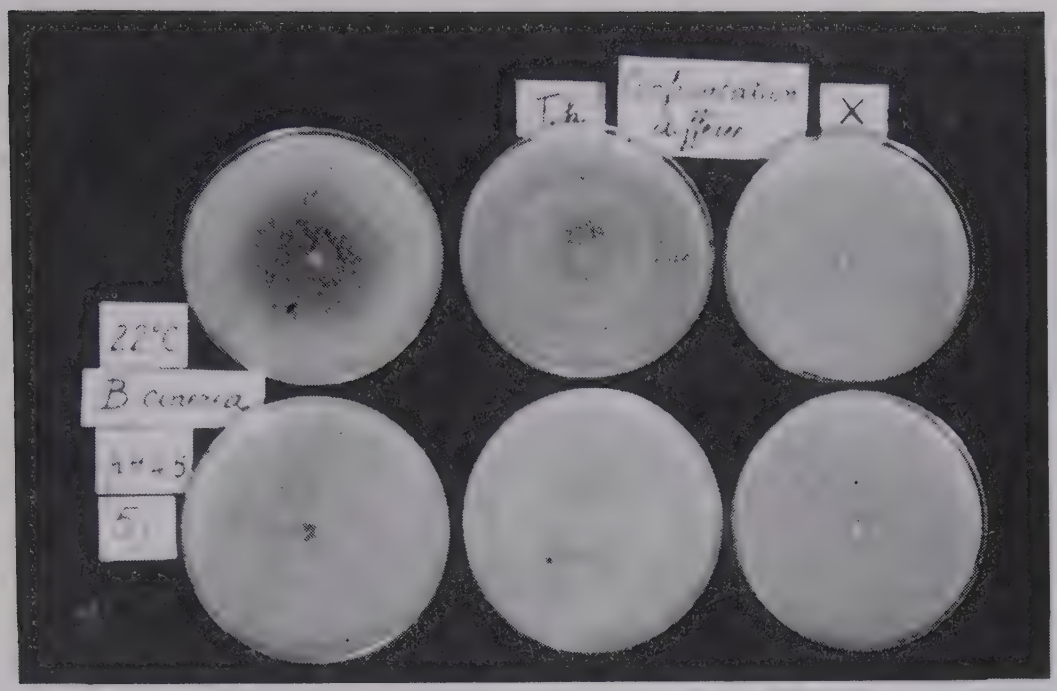
YANG H., POWELL N.I., BARKER K.R. - 1976 - The influence of *Trichoderma harzianum* on the root knot *Fusarium* wilt complex in Cotton. Journal of Nemathology, 8, 1, 81-86.

YOSHI'I H. - 1950 - Studies on *Cephalothecium* as a mean of artificial immunization of the agricultural crops.II. On the effect of treatement by the dried mycelium powder of *Cephalothecium* on the developpement of leaf blast in rice seedlings. Ann. Phytopathology Soc., Japan, 14, 9-10.

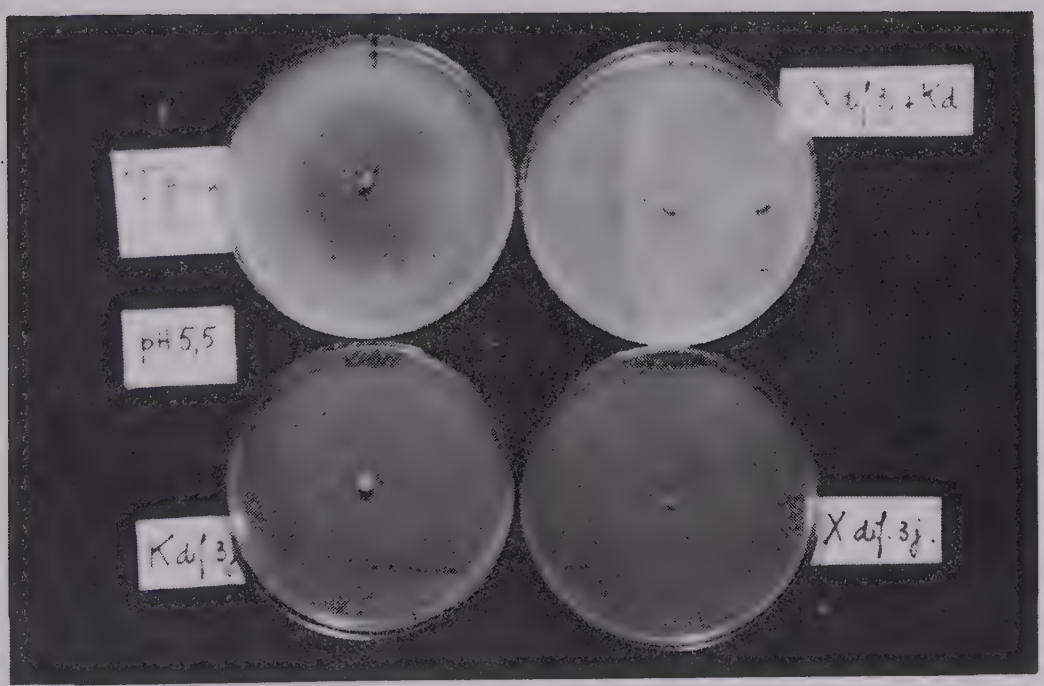
PLANCHE I

Figure 1 - Confrontation différée de *Myrothecium* sp. (n° 1) (= M) et de *Trichoderma* sp. (a) (= Ta) avec 2 souches de *Botrytis cinerea* (5 jours de confrontation sur PCA ; pH 4,5 ; 22° C ; obscurité).

Figure 2 - Confrontation différée de *Trichoderma* sp. (b) (= Tb) et de *Myrothecium* sp. (n° 1) (= M) associé ou non à la confrontation directe avec *Trichoderma* sp. (b) (= Tb) (6 jours de confrontation sur PCA ; pH 4,5 ; 22° C ; obscurité).



1

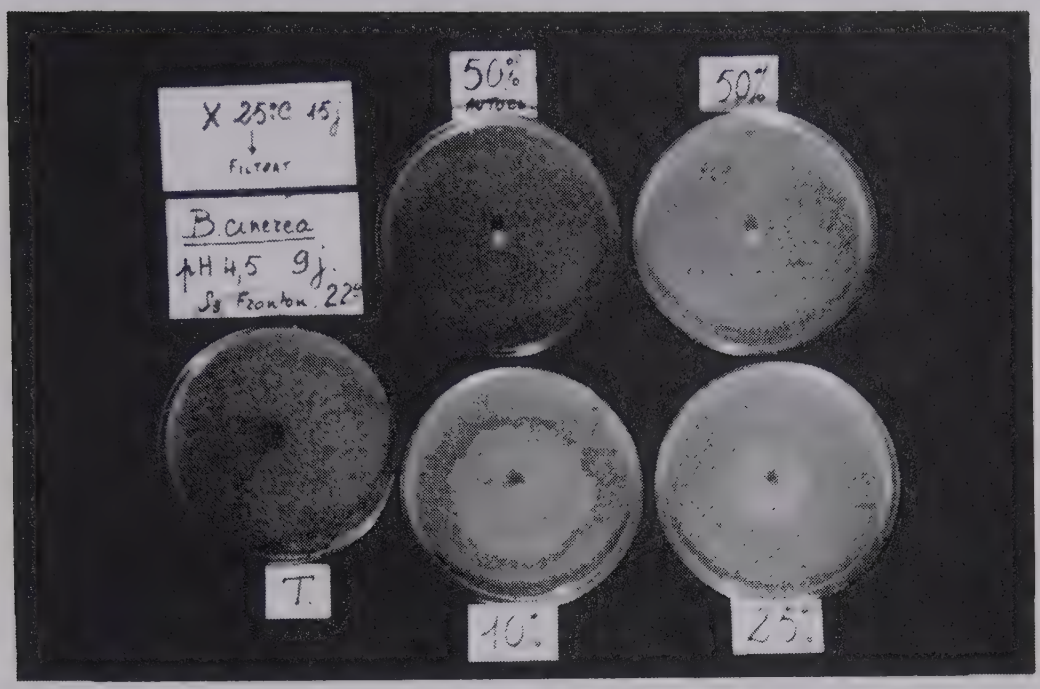


2

PLANCHE II

Figure 3 - Action de différentes dilutions (50 %, 25 %, 0 %) du filtrat brut de culture de *Myrothecium* sp. (n° 1) (= M) sur la croissance relative de *B. cinerea* (9 jours d'incubation sur milieu de RICHARDS gélosé ; à 22° C ; à l'obscurité ; pH_o 4,5 = pH initial du milieu sur lequel est repiqué *B. cinerea*).

Figure 4 - Action de différentes dilutions (50 %, 25 %, 0 %) du filtrat brut de culture de *Trichoderma* sp. (a) (= Ta) sur la croissance radiale de *B. cinerea* (7 jours d'incubation sur milieu RICHARDS gélosé ; à 22° C ; à l'obscurité ; pH_o 5,1).



3

4

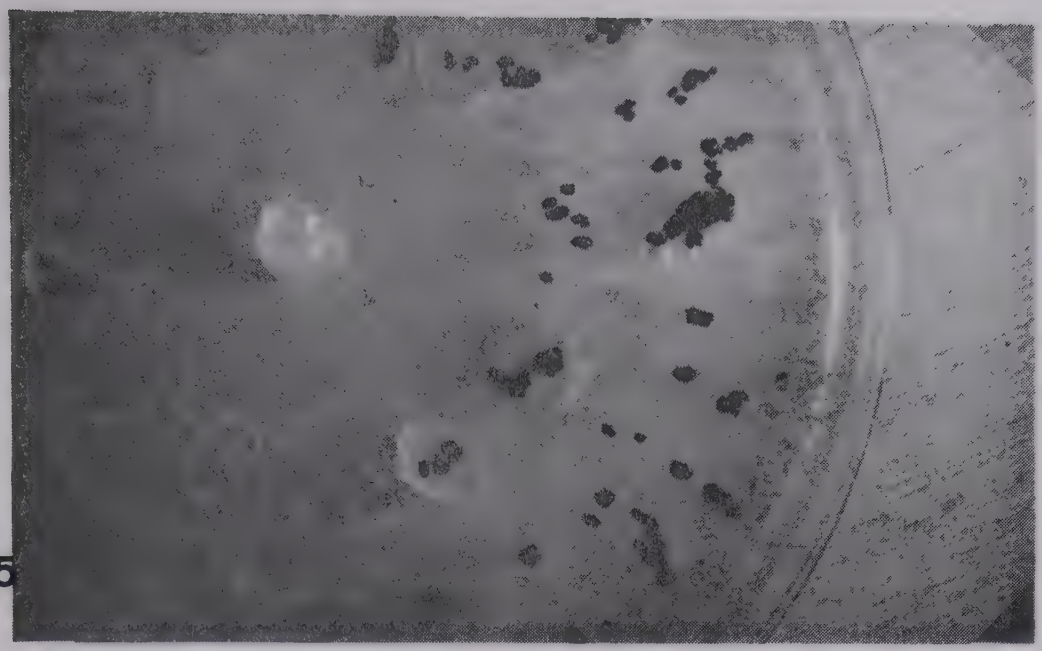
PLANCHE III

Action du filtrat brut de culture de *Myrothecium* sp. (n° 1) (= M) sur la croissance de maturation des sclérotes de *B. cinerea* (7 jours de confrontation sur milieu PCA ; à 22° C ; à l'obscurité. Culture initiale de *Myrothecium* sp. (n° 1) (= M) sur milieu de RICHARDS (pH_o 4,5).

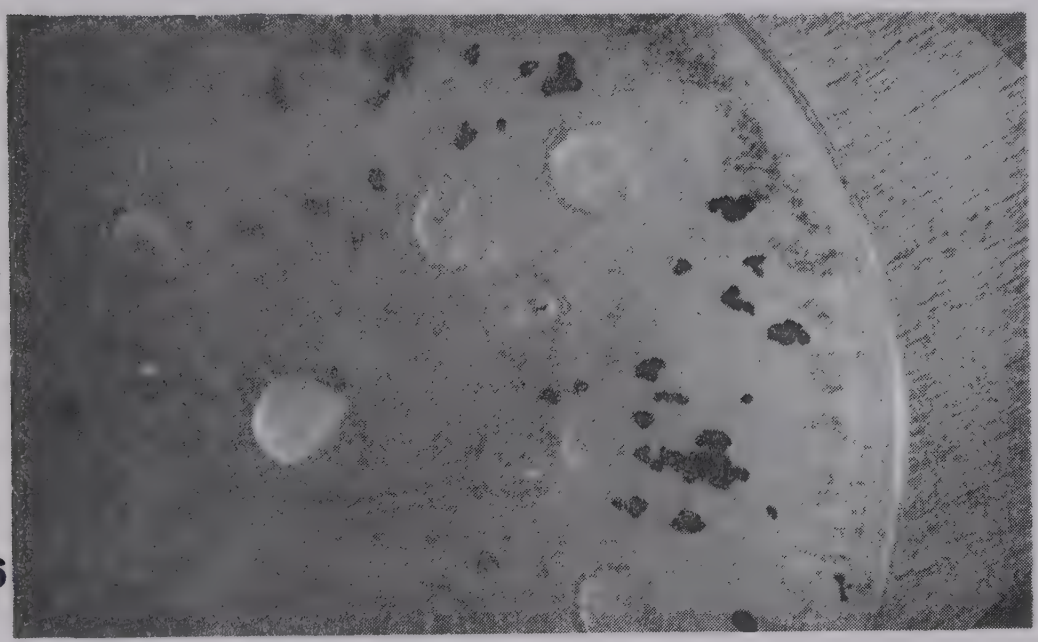
Figure 5 - Observation rapprochée du témoin. Application de 0,05 ml de milieu de RICHARDS à pH 4,5 : Maturation normale des sclérotes.

Figure 6 - Observation rapprochée. Application de 0,05 ml de filtrat brut de culture de *Myrothecium* sp. (n° 1) (= M) (pH_o 4,5) : Arrêt de l'évolution des sclérotes néoformés.

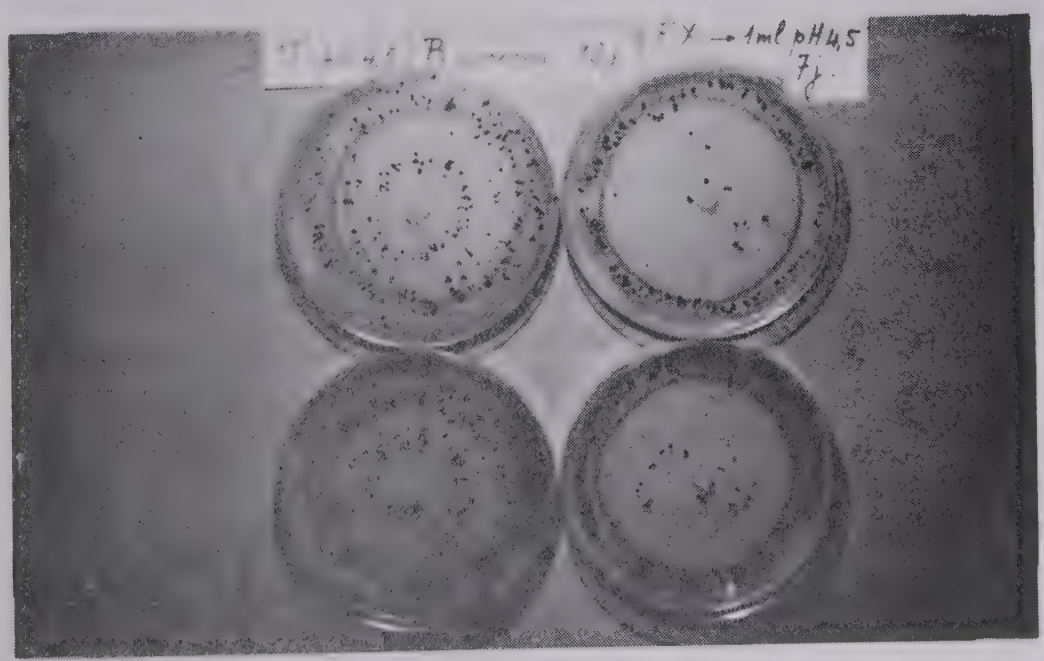
Figure 7 - Vue d'ensemble des boîtes de Petri témoins et "traitées".



5



6



7

PLANCHE IV

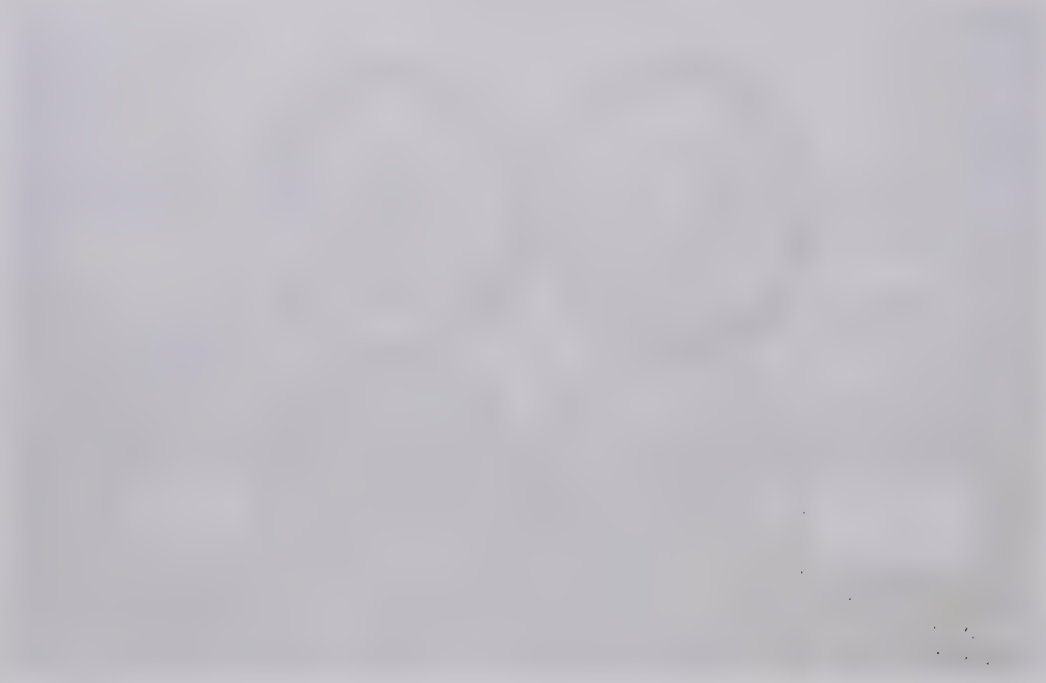
Figure 8 - Action du mycélium de *Trichoderma* sp. (a) (= Ta), de *Trichoderma* sp. (b) (= Tb) et de *Myrothecium* sp. (n° 1) (= M) sur la formation des sclérotes de *B. cinerea* (Souche n° 3) à 22° C. L'antagoniste a été ensemencé sous la forme d'un confetti mycélien au centre de la boîte ; au même instant le parasite a été ensemencé sous la forme de sclérotes déposés en cercle (15 mm de rayon) autour de l'inoculum antagoniste.

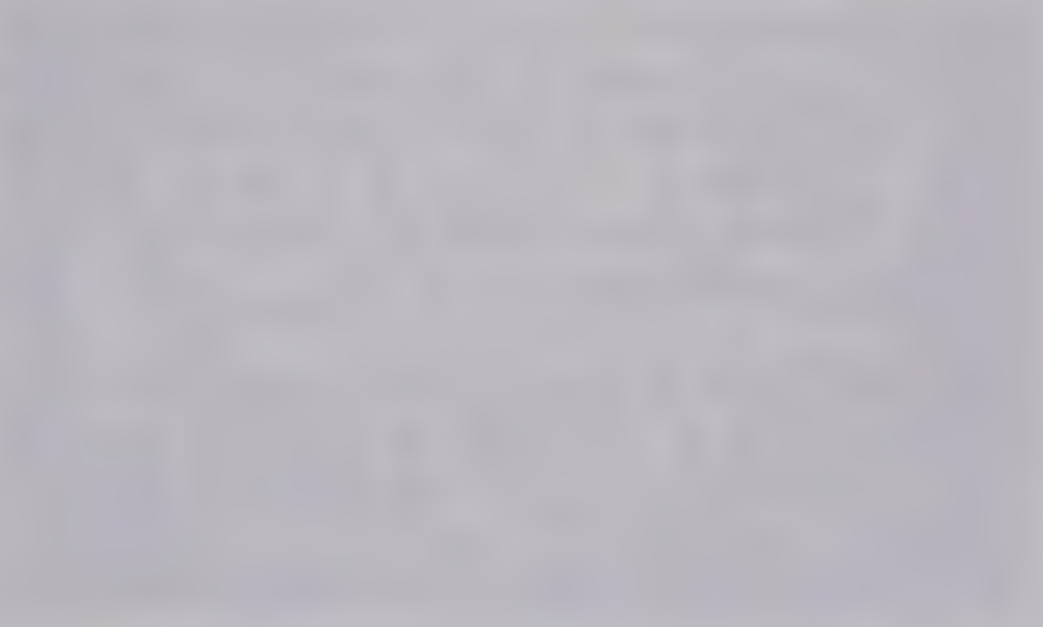
Figure 9 - Action du mycélium de *Trichoderma* sp. (b) (= Tb) et de *Fusarium lateritium* sur la formation des sclérotes de *B. cinerea* à 10° C.

Le parasite a été inoculé au centre de chaque boîte de Petri sous la forme d'un sclérote (mycéliogénèse) au même moment, disposés en croix autour du parasite (à 25 mm de distance de celui-ci). 20 jours d'incubation sur milieu PCA, à l'obscurité.

8

9





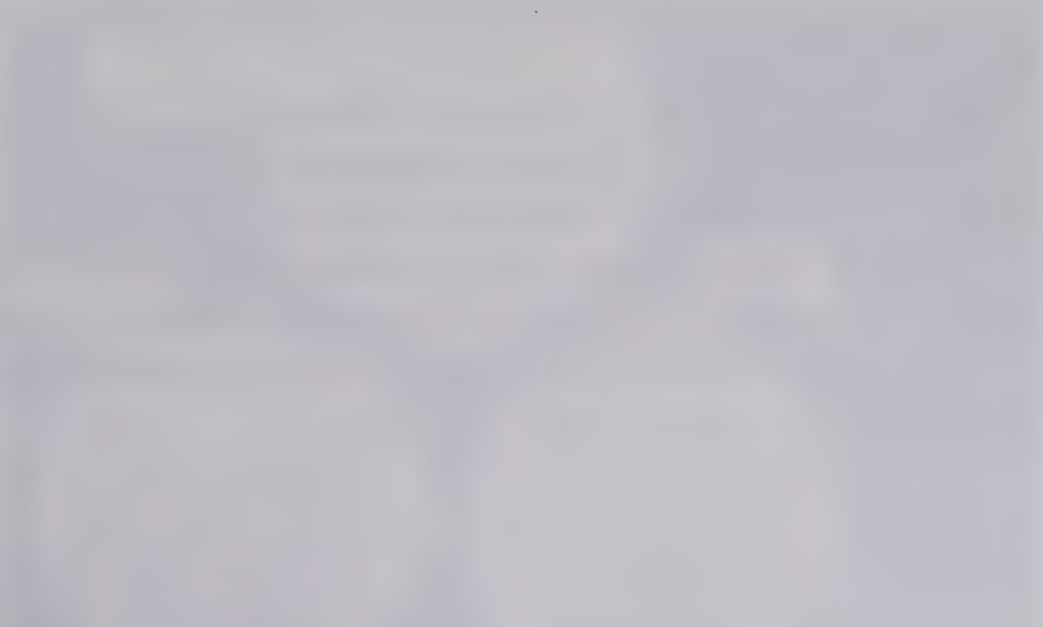


PLANCHE V

Action des antagonistes sur la germination des sclérotes de *B. cinerea*.

Figure 10 - Les sclérotes de *B. cinerea* ont été repiqués sur le mycélium des jeunes colonies de l'antagoniste croissant sur PCA (colonies de *Trichoderma* sp. (a) (= Ta) et de *Trichoderma* sp. (b) (= Tb) âgées de 3 jours, colonies de *Myrothecium* sp. (n° 1) âgées de 5 jours, au moment du repiquage du parasite). Boîte située en bas à droite : témoin.

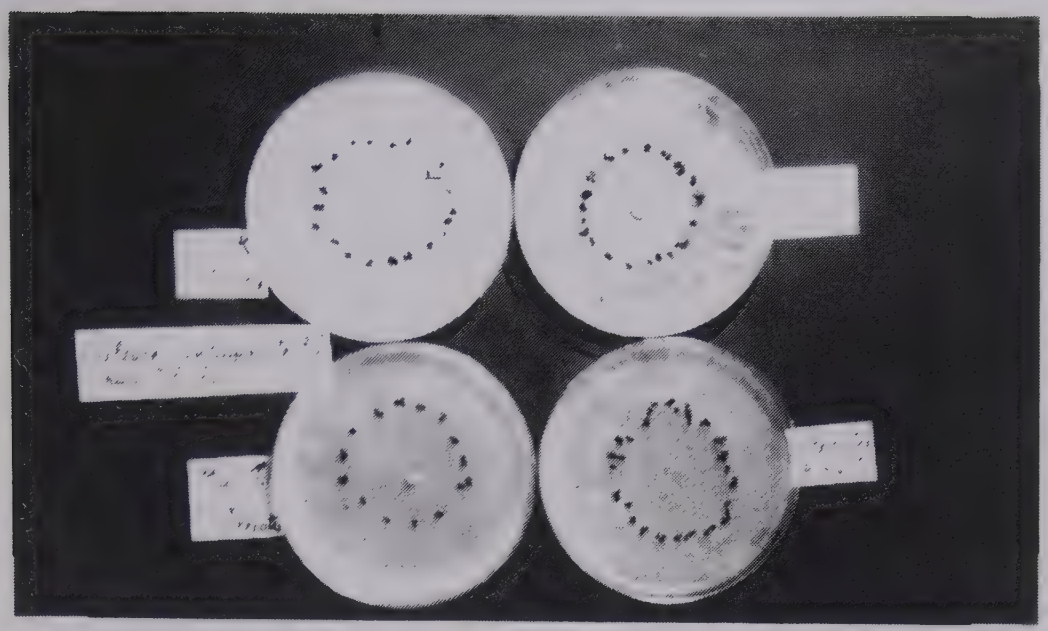
3 antagonistes inhibent la germination des sclérotes dans ces conditions.

Figure 11 - Action du filtrat de culture de *Trichoderma* sp. (a) (= Ta) et de *Myrothecium* sp. (n° 1) (= M) sur la germination des sclérotes, à 22° C (sur papier filtre, en boîte de Petri).

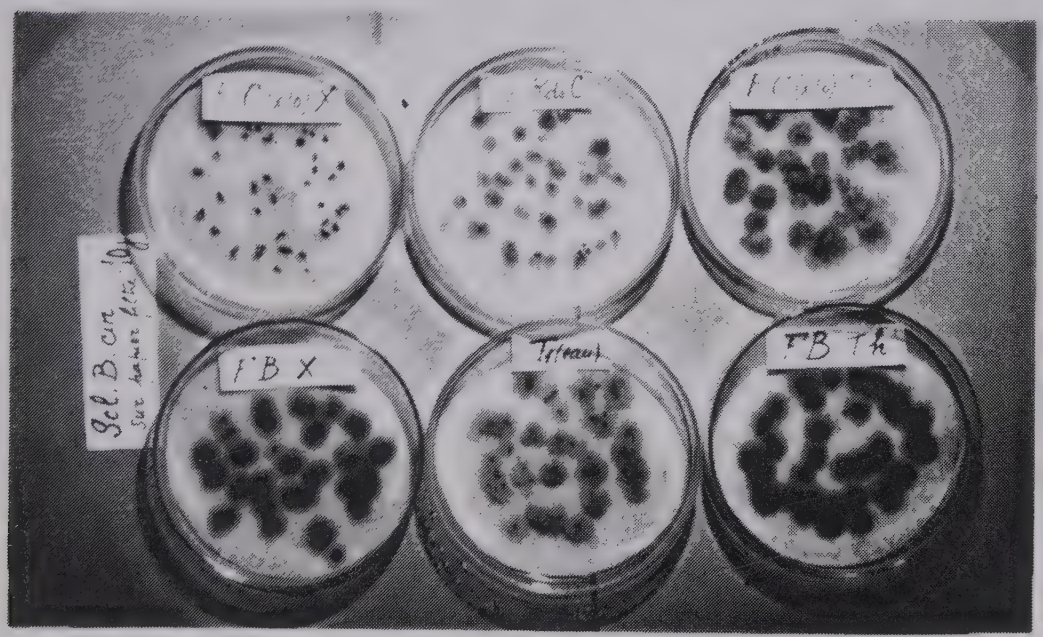
FB = filtrat brut. FC = filtrat concentré 10 fois

Seul le filtrat concentré 10 fois de *Myrothecium* sp. (n° 1) (= M) inhibe la germination des sclérotes.

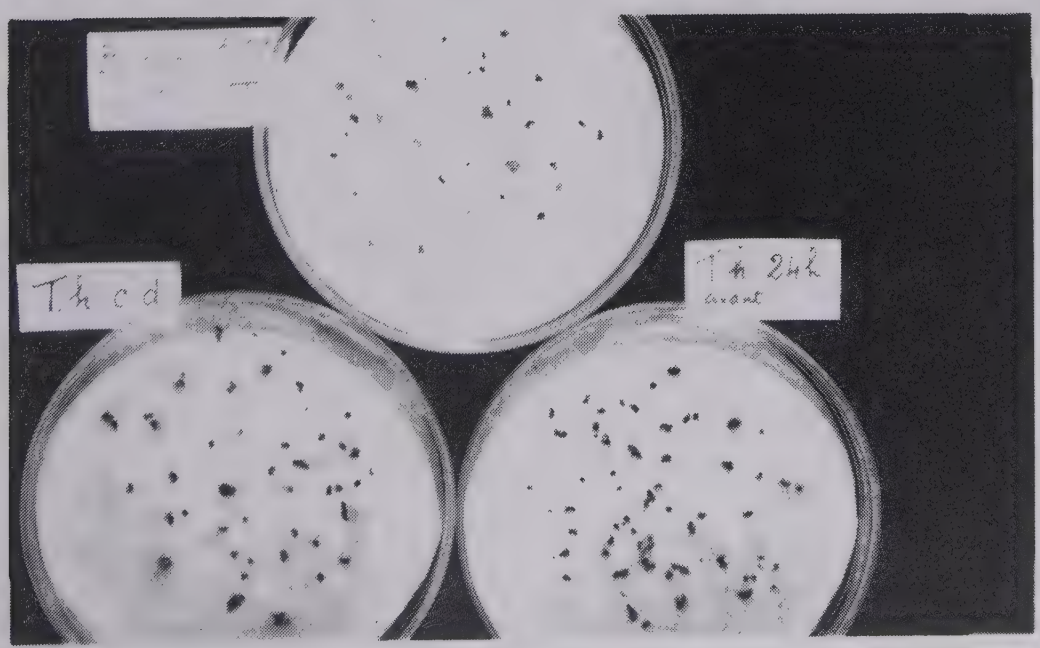
Figure 12 - Action de la suspension de fragments mycéliens de *Trichoderma* sp. (a) (= Ta) sur la germination des sclérotes à 5° C (sur papier filtre, en boîte de Petri). Lorsque le mycélium de Ta colonise la surface du papier filtre avant dépôt des sclérotes (boîte en bas à droite, la germination conidiogène des sclérotes est retardée et amoindrie.



10



11



12

PLANCHE VI

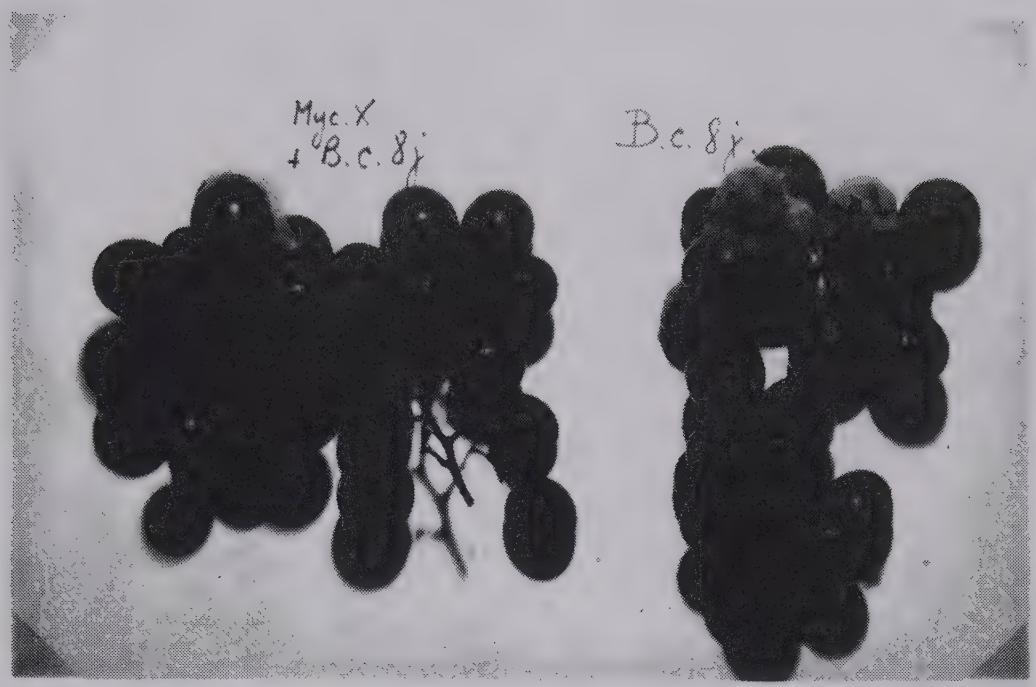
Action *in vivo*

Figure 13 - Application d'une suspension mixte de fragments mycéliens de *Myrothecium* sp. (n° 1) (= M) et de conidies de *B. cinerea* à des grappillons de Muscat de Hambourg.

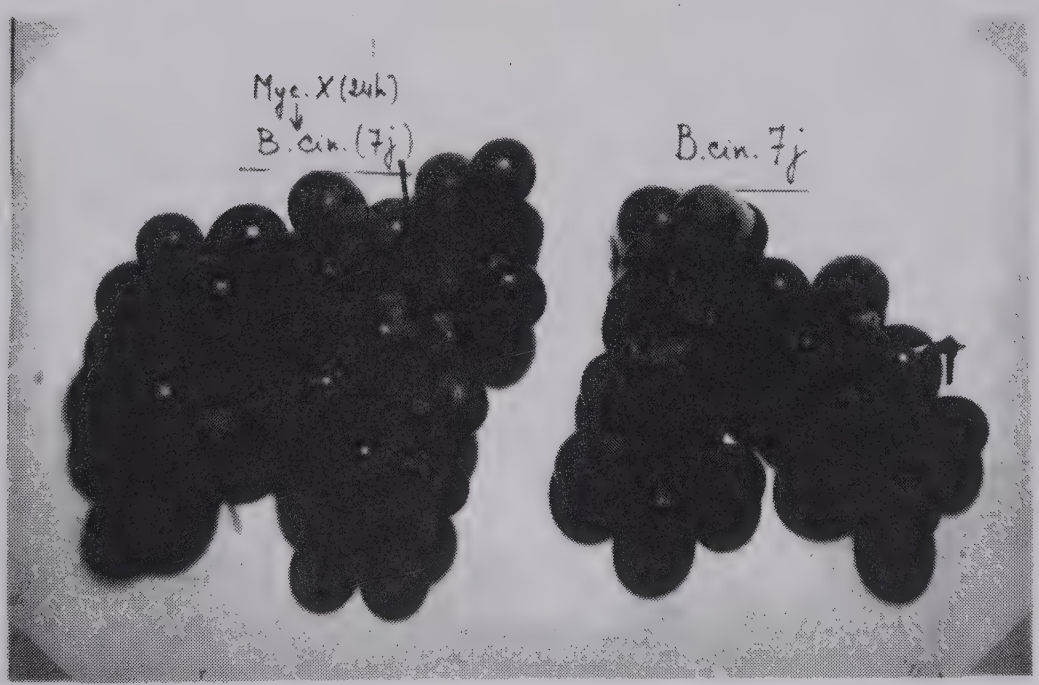
Photo prise après 8 jours d'incubation à 20° C (humidité saturante) photopériode = 12 h. (Adroite, témoin contaminé par *B. cinerea*).

Figure 14 - La suspension mycélienne de *Myrothecium* sp. (n° 1) (= M) a été appliquée 24 h avant la suspension conidienne de *B. cinerea* sur grappillons de Muscat de Hambourg.

7 jours à 20° C, humidité saturante, photopériode = 12 h.
(A droite, témoin).



13



14

PLANCHE VII

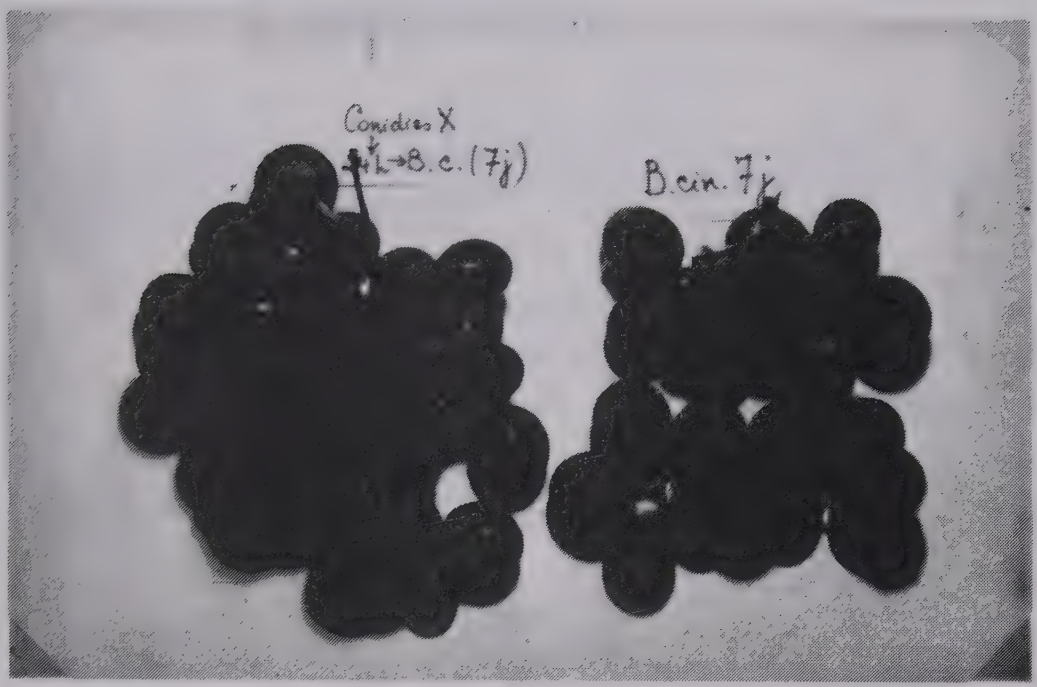
Action *in vivo*

Figure 15 - Suspension conidienne de *Myrothecium* sp. (n° 1) (= M) appliquée 24 heures avant la suspension conidienne de *B. cinerea* sur grappillons de Muscat de Hambourg.

7 jours à 20° C, humidité saturante, photopériode de 12 h.

Figure 16 - La suspension mycélienne de *Trichoderma* sp. (a) (= Ta) a été appliquée 24 h avant la suspension conidienne de *B. cinerea* à des grappillons de Mauzac.

10 jours à 20° C, humidité saturante, photopériode de 12 h.



15

16

/ ANNEXE TECHNIQUE /

A - NATURE DES SUBSTRATS TROPHIQUES UTILISES POUR LA CULTURE *in vitro* DU PARASITE ET DES ANTAGONISTES

A1. Milieu PCA : Pomme de terre - carotte - agar (préconisé par par LANGERON et le Commonwealth Mycological Institute)

Pulpe rapée de pomme de terre	20 g
Pulpe rapée de carotte	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

A2. Milieu PC : Milieu liquide (sans adjonction d'agar) à base de pomme de terre et de carotte.

A3. Milieu RICHARDS

KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4,7H_2O$	0,5 g
$FeSO_4,7H_2O$	0,005 g
$ZnSO_4$	0,005 g
$MnCl_2$	10 g
Glycocolle	2,250 g
Eau distillée	1000 ml

Ce milieu est autoclavé à 104° pendant 20 mn.

B - COMPOSITION DU TAMPON MAC ILVAINE

Acide citrique, H_2O M/10	Phosphate disodique KH_2O M/5	pH
196,00 ml	40,00	2,2
158,90 ml	41,00	3,0
150,60 ml	49,40	3,2
143,00 ml	57,00	3,4
122,90 ml	77,10	4,0
111,80 ml	88,20	4,4
92,80 ml	107,20	5,2
79,10 ml	120,90	5,8
61,50 ml	138,50	6,4
35,30 ml	164,70	7,0
18,30 ml	181,70	7,4
5,50 ml	194,50	8,0

STITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE TOULOUSE

D E C I S I O N

Le Président de l'Institut National Polytechnique de TOULOUSE

VU les dispositions de l'article 11 de l'arrêté du 16 avril 1974 sur le DIPLOME DE DOCTEUR-INGENIEUR

VU le rapport de thèse établi par un des membres du jury

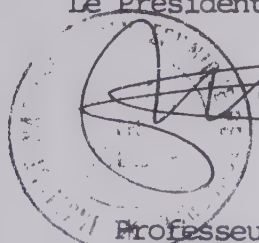
AUTORISE Monsieur NORNG Khamoeun

à présenter une thèse en soutenance pour l'obtention du DIPLOME de DOCTEUR-INGENIEUR devant un jury composé de :

M. HAMANT, Professeur — Président

M. ALBERTINI, Professeur à 1'I.N.P.T.
M. FREYDIER, Ingénieur Agronome
M. LABAT, Professeur à 1'I.N.P.T.
M. MICHEL, Professeur à 1'U.P.S.
M. SY, Docteur Ingénieur
— Membres

A TOULOUSE, le 19 octobre 1979
Le Président de l'I.N.P.T.



Professeur G. MONTEL

DACTYLOGRAPHIE & DUPLICATION

E.N.S.A.T.